Charakterisierung des Heterochromatins und der ribosomalen Cistrons bei *Drosophila affinis*

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen

Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Mireille Schäfer

aus Baden-Baden

Düsseldorf

1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544318_0013

Charakterisierung des Heterochromatins und der ribosomalen Cistrons bei *Drosophila affinis*

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen

Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Mireille Schäfer

aus Baden-Baden

Düsseldorf

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I	Einleitung	1
II	Material und Methoden	3
	1. Konstitution der verwendeten Fliegenstämme und deren Aufzucht	3
	2. Verwendete Lösungen	4
	3. Bestimmung des DNA-Gehaltes von *D. affinis*	5
	4. Lichtmikroskopische Untersuchungen	6
	4.1. Spermienlängen	6
	4.2. Lampenbürstenstrukturen in Spermatozytenkernen	6
	5. DNA-Isolierung	6
	6. Isopyknische Gradientenzentrifugation	7
	6.1. Analytische Ultrazentrifugation	7
	6.1.1. Zentrifugation in neutralem CsCl	7
	6.1.2. Analytische Ultrazentrifugation komplexierter DNA-Proben	7
	6.2. Präparative Ultrazentrifugation	8
	6.2.1. Reinigungsläufe	8
	6.2.2. Fraktionierungsläufe	8
	6.3. Komplexierungsuntersuchungen an *D. affinis*-DNA	9
	6.3.1. DNA-Bindung mit Silberionen	9
	6.3.2. Komplexierung mit Hg^{++}-Ionen	9
	6.3.3. DNA-Komplexierung mit Netropsinsulfat	10
	7. Schmelzanalysen	10
	8. Radioaktive Markierung von rRNA und DNA	10
	8.1. rRNA-Markierung	
	8.1.1. Gewinnung von ^{3}H-rRNA aus *D. melanogaster*-Larven	10
	8.1.2. ^{32}P-Markierung von rRNA aus Schneider's *D. melanogaster*-Zellinie Nr. 2	11

Seite

8.2. Nick-Translation 12
8.2.1. Radioaktive Markierung der rDNA-Clone 12
8.2.2. ^{14}C-Markierung von Gesamt-DNA 14
8.3. Jodinierung der durch Komplexierung gewonnenen DNA-Fraktionen 14
9. Filtersättigungshybridisierungen 15
10. In situ-Hybridisierungen 16
10.1. Herstellung von Mitosechromosomenpräparaten 16
10.2. Hybridisierungen 16
10.2.1. Hybridisierungen mit rDNA-Clonen 16
10.2.2. In situ-Hybridisierung mit jodinierten DNA-Fraktionen 17
10.3. Autoradiographie 18
11. Restriktionsanalysen 18
11.1. Restriktionsenzyme und Inkubationsbedingungen 18
11.2. Elektrophoretische Auftrennung der Restriktionsfragmente 19
11.3. Southern-Transfer 19
11.4. Hybridisierung 19
11.5. Autoradiographie 20
III Ergebnisse 21
1. Zytologische Beobachtungen 21
1.1. Spermatozytenkerne 21
1.2. Spermienlänge 22
2. DNA-Analysen 22
2.1. Isopyknische CsCl-Gradientenzentrifugation 22
2.2. Schmelzanalysen 24
3. Differentielle Zentrifugation 25
3.1. Komplexierung mit Silberionen 25
3.2. Bandierungsverhalten der D. affinis-DNA mit Quecksilber 28
3.3. Komplexierung mit Netropsinsulfat 30

Seite

3.4. Genomfraktionierung mit Hilfe zweier Komplexanden 30
3.4.1. DNA-Bindung mit Queck-silber und Netropsinsulfat 30
3.4.2. DNA-Bindung mit Queck-silber und Silber 34
3.4.3. DNA-Bindung mit Netrop-sinsulfat und Silber 36
4. Versuch der Lokalisation bestimmter DNA-Fraktionen 38
5. rDNA-Analysen 41
5.1. Lokalisation der rRNA-Gene 41
5.2. Bestimmung der Cistronzahlen bei D. affinis 43
5.3. Restriktionsanalysen 44
5.3.1. DNA-Verdauung mit Eco RI 44
5.3.2. Restriktionsanalyse mit Bam HI 47
5.3.3. rDNA-Fragmente nach Restrik-tion mit HindIII 49
5.3.4. Verdauung von D. affinis-DNA mit HaeIII 51

IV Diskussion 55
V Zusammenfassung 61
VI Literaturverzeichnis 63
VII Anmerkung 70
VIII Lebenslauf 71

I Einleitung

Bei mehreren Arten der Gattung Drosophila wurde eine große Variabilität des Y-Chromosoms beobachtet, die im Extremfall bis zur X/O-Situation gehen kann (Y-Polymorphismus; z.B. Miller und Stone, 1962). Eine in dieser Hinsicht gut untersuchte Art ist Drosophila affinis (Miller und Stone, 1962; Voelker und Kojima, 1971). Neben den natürlich vorkommenden X/O-Männchen (Y^O) wurden zwei Populationen beschrieben, die ein langes (Y^L) oder ein etwa halb so großes kurzes Y-Chromosom (Y^S) besitzen.

Während Y^L- und Y^S-Tiere eine normale Vitalität aufweisen, sind Y^O-Männchen vermindert vital und werden daher in Konkurrenzsituationen verdrängt (Voelker und Kojima, 1971).

Bei vielen Drosophila-Arten sind die Gene für die ribosomale RNA (rDNA) auf beiden Geschlechtschromosomen lokalisiert (z.B. Ritossa und Spiegelman, 1965). Da einer der Nukleolenorganisatoren (NO) vermutlich auch bei D. affinis auf dem Y-Chromosom liegt, könnte die beobachtete Vitalitätsminderung der Y^O-Tiere auf einen rDNA-Mangel zurückzuführen sein.

Die primären Spermatozytenkerne vieler, möglicherweise aller Drosophila-Arten enthalten spezielle Strukturen, die weder in anderen Keimzellstadien noch in somatischen Zellen beobachtet wurden. In zytologisch gut analysierbaren Arten wie Drosophila hydei und Drosophila melanogaster konnte gezeigt werden, daß diese Strukturen vom Y-Chromosom und etwa nach Art der Lampenbürstenschleifen ausgebildet werden. Weitere zytogenetische Experimente führten zu der Deutung, daß diese "Schleifen" der zytologisch sichtbare Ausdruck der schon lange bekannten Y-Fertilitätsfaktoren sind (Zusammenfassung: Hess und Meyer, 1968). Da bei D. affinis Y^O-Tiere fertil sind, ist zu fordern, daß diesen Fertilitätsfaktoren homologe Faktoren an anderen Stellen des Genoms lokalisiert sind.

Heterochromatische Chromosomen oder Chromosomenabschnitte enthalten häufig hochrepetitive DNA (Satelliten). Bei Drosophila-Arten, bei denen das Y-Chromosom eine Funktion für die Fertilität hat, konnten jedoch nur geringe

Mengen an Satellitensequenzen auf den Y-Chromosomen nachgewiesen werden (Hennig, 1972; Gall et al., 1971; Renkawitz, 1978). Bei D. affinis stellt sich die Frage, ob hier das Y-Chromosom eher dem normalen Heterochromatin gleicht, indem es in hohem Maße hochrepetitive DNA enthält.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die DNA des heterochromatischen Y-Chromosoms von D. affinis im Hinblick auf die drei genannten Gesichtspunkte zu charakterisieren.

Gradientenzentrifugationen und Schmelzanalysen sollten Aufschluß darüber geben, ob Satellitenfraktionen in Abhängigkeit vom Y-Chromosom vorhanden sind.

Mit zytologischen Methoden wurde versucht, eine Aussage über Fertilitätsfaktoren des Y-Chromosoms zu machen.

Um die rDNA von D. affinis zu lokalisieren und charakterisieren, wurden in situ-Hybridisierungen, Filtersättigungshybridisierungen und Restriktionsanalysen der rDNA an den verschiedenen Stämmen durchgeführt.

II Material und Methoden

1. Konstitution der verwendeten Fliegenstämme und deren Aufzucht

Die verschiedenen Drosophila affinis-Stämme wurden mir von Dr. A. Voelker (Eugene, Oregon) und der Genetics Foundation der Universität von Texas (Austin) zur Verfügung gestellt.

Es wurden folgende Stämme verwendet:

- Stämme mit langem Y-Chromosom: "Y^L" mit den genetischen Markern bw (= brown, Augenpigment-Mutante auf Chromosom 4), pi (= pinkish eyes, Chromosom 3) und up (= upturned wings, Chromosom 2). Ein zweiter Y^L-Stamm trug keinerlei genetische Marker (Wildstamm, Dry Creek, Austin, Texas).

- Stämme mit kurzem Y-Chromosom: "Y^S" mit den gleichen genetischen Markern wie der erste Y^L-Stamm (bw, pi, up). Ein zweiter Y^S-Stamm trug die X-chromosomalen Marker sc (= scute) und v (= vermilion).

- Der Stamm ohne Y-Chromosom (Y^O) trug die X-chromosomalen Marker rs (= rose eyes) und jv (= javelin bristles).

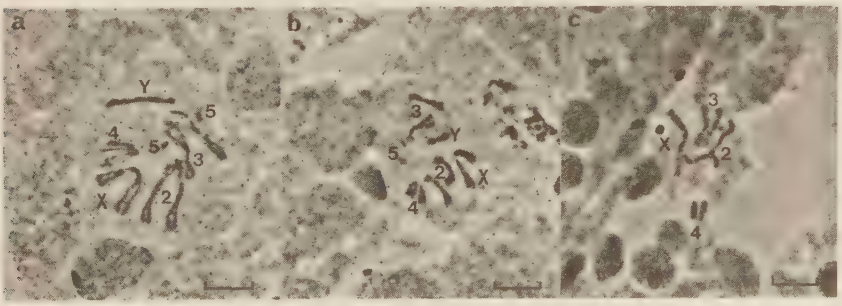


Abb.1: Metaphaseplatten von larvalen Neuroblasten der verwendeten D. affinis-Stämme
a) Metaphase eines Y^L-Männchens, b) Metaphase eines Y^S-Männchens, c) Metaphase eines Y^O-Männchens
Der Strich in den Abbildungen entspricht 5 µm.

Drosophila affinis besitzt vier Paar Autosomen, ein subtelozentrisches großes (Chromosom 2), ein unwesentlich kürzeres metazentrisches (Chromosom 3), ein telozentrisches von nahezu der Hälfte der Länge (Chromosom 4) und ein punktförmiges Autosomenpaar (Chromosom 5; Die Nummerierung der Chromosomen erfolgte nach Miller und Stone, 1962; siehe Abb.1). Das längste Chromosom ist das metazentrische X-Chromosom; das kinetochornahe Drittel des einen Armes ist bei diesem Chromosom heterochromatisch. Das Y^L-Chromosom, ein subtelozentrisches Chromosom, ist von der Größe des zweiten Chromosomenpaares (vgl. Abb.1a). Das Y^S-Chromosom dagegen ist ein kleines, nahezu metazentrisches, heterochromatisches Element (vgl. Abb.1b).

Drosophila affinis-Stämme wurden bei 23 ± 1°C in Plastikflaschen auf einem Nährmedium aus Agar, Sojamehl, Mais, Malz, Sirup und Bierhefe gezüchtet. Als Schutz vor Verpilzung wurden Nipagin (Hydroxybenzoesäuremethylester) und Propionsäure zugesetzt (siehe Hess, 1976). Unter diesen Bedingungen betrug die Generationszeit 12 bis 13 Tage.

2. Verwendete Lösungen

HOM I: 0.05M Tris/HCl pH 7.4 (Tris = Tris-(hydroxyäthyl)-aminomethan); 0.004M $CaCl_2$; 2M Saccharose

HOM II: wie HOM I nur 0.3M Saccharose

Lyse-Medium (DNA): 0.5% Sarkosyl (Natrium-N-lauroyl-sarkosinat); 0.1M EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure); 0.05M Tris/HCl pH 8.4; 1M NaCl; 300µg/ml Proteinase K (3 Stunden bei 37°C vorinkubiert)

SSC (Standard Saline Citrate) 0.15M NaCl; 0.015M Natriumcitrat pH 7.0

Drosophila-Ringer: 0.184M KCl; 0.046M NaCl; 0.003M $CaCl_2$ 0.01M Tris/HCl pH 7.2

Phenolreagenz: 500g Phenol; 70g m-Kresol; 0.5g 8-Hydroxichinolin; 55ml aqua destillata

Homogenisierungslösung (RNA): 20ml Phenolreagenz; 20ml 0.01M Phosphatpuffer (KH_2PO_4 pH 6.8); 10ml NDS (0.5% w/v Naphthalin-1,5-disulfonsaures Natriumsalz); 1.4ml SDS (25% w/v Natriumdodecylsulfat); 1ml 5% w/v Bentonit;

200µg/ml Heparin (H.-J. Bohnert, pers. Mitteilung)
Detergenzlösung: 1% SDS; 2.5% Sarkosyl; 0.1M NaCl; 0.002M EDTA; 0.02M Tris/HCl pH 7.4
Lyse-Medium (RNA): 0.05M Tris; 1% SDS; 300µg/ml Proteinase K
10x Salzlösung: 0.5M Tris/HCl pH 7.9; 0.05M $MgCl_2$; 0.1M 2-Mercaptoäthanol; 500µg/ml Rinderserumalbumin
Ansäuerungslösung: 0.44 $x10^{-3}$N H_2SO_4; 0.126 $x10^{-3}$M Na_2SO_3; 0.1 $x10^{-3}$M KJ
$TlCl_3$-Lösung: 1.4 $x10^{-3}$M Tl(III)Cl_3; 0.166M Natriumacetat; 0.033M Essigsäure pH 5
Phosphatpuffer: zu gleichen Teilen Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4 pH 6.8
Chromalaun-Gelatine: 0.5% Gelatine; 0.05% $KCr(SO_4)\cdot 12\ H_2O$
Reaktionspuffer (EcoRI): 0.1M Tris/HCl pH 7.5; 50mM NaCl; 10mM $MgCl_2$
Stop-Lösung: 7M Harnstoff; 50% w/v Saccharose; 0.1mM EDTA; 0.1% Bromphenolblau
Reaktionspuffer (HaeIII): 6mM Tris/HCl pH 7.4; 6mM $MgCl_2$; 6mM 2-Mercaptoäthanol
Tris/Acetat-Puffer: 40mM Tris; 5mM Natriumacetat; 1mM EDTA; pH 7.75 eingestellt mit Essigsäure
Denaturierungslösung: 1.5M NaCl; 0.5M NaOH
Neutralisationslösung: 3M NaCl; 0.5M Tris/HCl pH 7.0
Hybridisierungslösung (nach Dawid, 1977): 0.6M NaCl; 0.2M Tris/HCl pH 8.0; 0.02M EDTA; 50% v/v Formamid

3. Bestimmung des DNA-Gehaltes von D. affinis

Der DNA-Gehalt wurde an Feulgen-gefärbten Quetschpräparaten von larvalen Neuroblasten dadurch bestimmt, daß die Extinktion bei 546nm mikrophotometrisch mit dem Zeiss UMSP gemessen wurde. Als Referenz dienten gleich behandelte Neuroblastenpräparate von D. melanogaster, deren diploider DNA-Gehalt mit 0.36 pg angenommen wurde (Rasch et al., 1971). Die Messungen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. H.G. Keyl (Bochum) durchgeführt.

4. Lichtmikroskopische Untersuchungen

4.1 Spermienlängen

Aus adulten Männchen wurden die Hoden in Ringerlösung präpariert. In einem kleinen Ringertropfen auf einem Objektträger wurde die Hodenhülle durch Auflegen eines Deckglases zerrissen und der Hodeninhalt herausgedrückt. In dem Lebendpräparat wurden motile Spermien im Phasenkontrast-Mikroskop photographiert (Zeiss Photomikroskop II; Blitzeinrichtung Zeiss Ukatron UN 60; Agfapan 100 -Film). Auf den Photos wurden dann die Spermien vermessen und ihre Länge entsprechend dem Abbildungsmaßstab errechnet.

4.2. Lampenbürstenstrukturen in Spermatozytenkernen

Zur Beobachtung von Spermatozytenkernen wurden Hoden frischgeschlüpfter Männchen verwendet. Präparation und Dokumentation erfolgte wie für die Spermienmessungen.

5. DNA-Isolierung

Die DNA der verschiedenen D. affinis-Stämme wurde in Anlehnung an Renkawitz (1977) aus einer Kernfraktion gewonnen. Hierzu wurden bis zu 10g Fliegen tiefgefroren in 50ml HOM I im VirTis 45 Homogenisator (Cenco) mit 20000 rpm 10 min. bei 0°C homogenisiert. Nach Filtration durch eine Gaze (69µm Maschenweite) wurden die Kerne pelletiert (JA 20-Rotor, 17000rpm, 8 min., 4°C, J21B-Beckman-Kühlzentrifuge). Der Überstand wurde erneut , diesmal durch ein 5ml HOM I-Kissen zentrifugiert (JA 20, 17000rpm, 20min., 4°C). Die Pellets dieser Zentrifugationen wurden in einer Mischung aus 20ml HOM I und 2.5ml HOM II resuspendiert (Endkonzentration 1.8M Saccharose) und nochmals durch 20ml HOM I pelletiert (JA 20, 18000rpm, 20min., 4°C). Das Kernpellet wurde in 10ml Lyse-Medium durch Schwenken gelöst und 2h bei 37°C inkubiert. Das Lysat wurde 15h gegen 0.1xSSC dialysiert, und die noch vorhandenen Chitinreste wurden durch Zentrifugation aus der DNA-Lösung entfernt (JS 13, 5000rpm,

5min., 4°C).

6. Isopyknische Gradientenzentrifugation

6.1 Analytische Ultrazentrifugation

6.1.1. Zentrifugation in neutralem CsCl

Zur Ermittlung der Dichteverteilung der DNA aus D. affinis wurden bis zu 3µg DNA der verschiedenen Stämme mit 0.25 bis 0.15µg Marker-DNA (Micrococcus lysodeikticus, ϱ = 1.731 g/cm^3; Miles, Frankfurt) gemischt und mit CsCl in 0.1xSSC bis zu einer Dichte von ϱ = 1.685g/cm^3 versetzt. Die Zentrifugation erfolgte im AnF-Rotor in Zellen mit Kel-F-Doppelsektormittelstücken bei 20°C und 44000rpm in der Beckman Model E Analytischen Ultrazentrifuge. Nach 20 bis 24h wurde die Dichteverteilung mit einer Scannereinrichtung bei 262nm aufgezeichnet. Die Dichte wurde nach der Gleichung von Schildkraut et al. (1962) berechnet.

6.1.2. Analytische Ultrazentrifugation komplexierter DNA-Proben

Um eine größtmögliche Auftrennung der Gesamt-DNA mit Hilfe der verschiedenen Komplexierungsagentien zu erreichen, wurden zunächst in der Analytischen Ultrazentrifuge unterschiedlich stark gebundene Proben miteinander verglichen. Ag^+-, Hg^{++}-Ionen bzw. Netropsinsulfat wurden in der unter 6.3 beschriebenen Weise an DNA-Proben (zwischen 3 und 5µg) gebunden und in dem entsprechenden Salzgradienten (s.u.) zentrifugiert und analysiert wie unter 6.1.1.

Im Falle der mit Ag^+-Ionen verbundenen DNA-Proben wurde Cs_2SO_4 (in 0.1M Na_2SO_4; 0.005M $Na_2B_4O_7$ pH 9.2) von der Anfangsdichte ϱ = 1.527g/cm^3 als Gradientenmaterial eingesetzt; bei Hg^{++}-komplexierter DNA wurde Cs_2SO_4 (in 0.02M $Na_2B_4O_7$ pH 9.2) der Dichte ϱ = 1.497g/cm^3 bis 1.527 g/cm^3 verwendet. Bei diesen beiden Komplexierungsmethoden wurden Rf-Werte zwischen 0.1 und 0.5 getestet (Rf = µMol Ag^+- bzw. Hg^{++}-Ionen zu µMol Nukleotiden).

Bei der Verwendung von Netropsinsulfat wurde die Zen-

trifugation in CsCl der Dichte ϱ_i = 1.675g/cm^3 vorgenommen. Es erwies sich als sehr günstig, dabei in den Referenzsektor eine entsprechende Menge Netropsinsulfat einzufüllen, da Netropsinsulfat UV-Licht absorbiert und während der Zentrifugation ebenfalls einen Gradienten aufbaut. Ohne Netropsinsulfat im Referenzsektor war die Erkennung geringerer Komponenten und eng benachbarter Fraktionen erschwert (eigene unveröffentlichte Beobachtungen). Mit Netropsinsulfat wurden Bindungsverhältnisse (µg Netropsinsulfat: µg DNA) von 1.0, 1.5, 2.0 und 3.0 getestet.

6.2. Präparative Ultrazentrifugation

6.2.1. Reinigungsläufe

Mit kristallinem Cs_2SO_4 wurden 6ml der DNA-Lösung bis zu einer Dichte von ϱ_i = 1.370g/cm^3 versetzt. Die restliche DNA-Lösung wurde auf eine Dichte von ϱ_i = 1.570g/cm^3 eingestellt, mit Cs_2SO_4-Lösung gleicher Dichte auf 6ml aufgefüllt und unter die leichte Stufe unterschichtet. Die Stufengradienten wurden 20 bis 25h bei 38000rpm und 20°C im Al 65- oder Ti 75-Rotor zentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge L3) und anschließend am ISCO-Gradientenfraktionator 640 unter Messung der Absorption bei 254nm mit dem ISCO-Absorbance Monitor UA-5 fraktioniert. Die DNA-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und noch mindestens einmal über Stufengradienten gereinigt, bis eine Hyperchromizität von mindestens 33% erreicht war

$$\left(\frac{OD_{100} - OD_{25}}{OD_{25}} \times 100 = 40\% \text{ entspricht reiner Doppelstrang-DNA}\right).$$

6.2.2. Fraktionierungsläufe

DNA-Proben, an die Ag^+ oder Hg^{++} gebunden worden waren, wurden mit Cs_2SO_4 auf Dichten von ϱ_i = 1.520 g/cm^3 bzw. 1.490 bis 1.520g/cm^3 eingestellt. Salzgradienten, die mit Silber gebundene DNA enthielten, wurden nur auf 8 bis 10ml Volumen aufgefüllt und mit Paraffin überschichtet. Im Falle der Komplexierungen mit Netropsinsulfat (siehe 6.3.3.)

wurden die DNA-Proben mit CsCl bis zu einer Dichte von ϱ = 1.660g/cm^3 versetzt. Die Zentrifugation erfolgte in allen Fällen im Al 65- oder Ti 75-Rotor bei 20°C und 38000rpm für 72 bis 80h. Die Fraktionierung und Analyse der Gradienten wurde mit dem ISCO-System vorgenommen.

6.3. Komplexierungsuntersuchungen an D. affinis-DNA

Zur Untersuchung der Bindung verschiedener Stoffe an D. affinis-DNA wurden die Proben im VirTis 60 (Cenco) geschert. Bei 20000rpm und 10min. Dauer (0°C) hatten die DNA-Proben ein mittleres Molekulargewicht von 6 bis 7x10^6 Daltons (etwa 10000 Basenpaare = 10kb). Das Molekulargewicht wurde durch Elektrophorese der Proben in 0.7% Agarose-Gelen und Vergleich der Wanderungsweite der DNA mit mitgelaufenen Längenstandards (Bakteriophagen-λ - DNA, mit HindIII verdaut; Boehringer, Mannheim) ermittelt.

6.3.1. DNA-Bindung mit Silberionen

Bei diesen Versuchen wurde nach Corneo et al. (1970) vorgegangen.

Die DNA wurde gegen 0.1M Na_2SO_4; 0.005M $Na_2B_4O_7$ (pH 9.2) ausgiebig dialysiert und mit Cs_2SO_4 versetzt. Eine 1.5mM $AgClO_4$-Lösung in Na_2SO_4; $Na_2B_4O_7$ (bzw. 0.15mM $AgClO_4$ bei geringen DNA-Mengen) wurde durch langsames Zupipettieren mittels einer Agla-Mikrometerspritze mit der DNA-Lösung gemischt.

Die Ag^+-Ionen wurden durch Dialyse gegen 6xSSC entfernt.

6.3.2. Komplexierung mit Hg^{++}-Ionen

DNA-Proben, die gegen 0.02M $Na_2B_4O_7$ (pH 9.2) dialysiert worden waren (Wilson et al., 1976), wurden mit Cs_2SO_4 versetzt. Eine Lösung von 0.6mM $HgCl_2$ in 0.02M $Na_2B_4O_7$ wurde in der gleichen Weise wie bei der Silberbindung mit der DNA-Lösung gemischt.

Aus den erhaltenen Fraktionen wurde das Quecksilber

durch Dialyse gegen 5M NaCl (Rinehart et al., 1977) entfernt.

6.3.3. DNA-Komplexierung mit Netropsinsulfat

Das Antibiotikum Netropsinsulfat (aus Streptomyces netropsis) wurde mir freundlicherweise von der Firma Farmitalia (Freiburg) kostenlos zur Verfügung gestellt. DNA-Proben wurden ausgiebig gegen 10mM Tris; 1mM EDTA pH 8.4 dialysiert und in Anlehnung an Brutlag et al. (1977) komplexiert. Eine Netropsinsulfatlösung von 0.1mg/ml Tris/EDTA wurde unter starkem Rühren langsam zupipettiert, bis das gewünschte Bindungsverhältnis erreicht war.

Das Netropsinsulfat wurde durch dreimaliges Ausschütteln der Proben mit Isopropanol, gesättigt mit gesättigtem CsCl, von der DNA entfernt, und die DNA wurde anschließend dialysiert.

7. Schmelzanalysen

Die optische Dichte der DNA-Proben in 0.1xSSC wurde mit dem Gilford 250 Spektrophotometer bei 260nm gemessen und auf einem Schreiber aufgezeichnet. Die Proben wurden in eine zuschraubbare, mit Teflon beschichtete Spezialküvette gegeben, die elektrisch beheizt wurde. Die Aufheizrate betrug 0.25°C/min. und wurde durch den Gilford Thermo-Programmer 2527 gesteuert und gemessen.

8. Radioaktive Markierung von rRNA und DNA

8.1. rRNA-Markierung

8.1.1. Gewinnung von ^{3}H-rRNA aus D. melanogaster-Larven

Eier von D. melanogaster wurden auf 8ml Maisbrei (70ml aqua dest.; 5.5g Maismehl; 2.5g Bierhefe; 0.8g Agar, K.D. Tartof, persönliche Mitteilung), dem je 2.5mCi 2-^{3}H-Adenosin (22Ci/mMol, Amersham-Buchler, Braunschweig) und 5-^{3}H-Orotsäure (21Ci/mMol, Amersham-Buchler, Braunschweig) beigemischt waren, zur Entwicklung gebracht. Kurz vor der

Verpuppung (etwa 10 Tage nach der Eiablage) wurden die Larven in Zuckerlösung aufgeschwemmt. Die RNA wurde nach Kirby, wie in Hennig et al. (1971) beschrieben, mit einigen Modifikationen (M. Schwochau, pers. Mitteilung) isoliert. In 52.4ml Homogenisierungslösung wurden die Larven (4g) im VirTis 45 homogenisiert (10min. 36000rpm und anschließend 15min. 4500rpm; 0°C). Die wäßrige Phase wurde dreimal mit Phenol, gesättigt mit Phosphatpuffer (KH_2PO_4), extrahiert. Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation mit 15000rpm bei 0°C für 15min. erreicht (JA 20).

Die RNA wurde mit 0.1 Volumen 2M Kaliumacetat und 2 Volumen 96% Äthanol bei -25°C gefällt. Nach Pelletierung wurde die RNA in einer Detergenzlösung (M. Schwochau, pers. Mitteilung) aufgenommen und in einem linearen Saccharosegradienten (RNase-freie Saccharose, Schwarz/Mann, Heidelberg; 5 - 50% w/w in Detergenzlösung) im SW40-Rotor bei 40000rpm und 0°C 20h zentrifugiert. Die Fraktionen, die die 28S rRNA enthielten, wurden erneut mit Kaliumacetat und Äthanol gefällt. Zur Hybridisierung wurde die RNA in 0.1xSSC gelöst und ihre spezifische Aktivität bestimmt; sie betrug 1.6 bis 1.8×10^5 dpm/µg.

8.1.2. ^{32}P-Markierung von rRNA aus Schneider's D. melanogaster-Zellinie Nr.2

Kulturflaschen wurden mit Schneider's Zellinie Nr.2 (Schneider, 1972) beimpft und die Zellen über Nacht in Schneider's Drosophila-Medium, revised (Gibco, BCK Biocult Chemie, Karlsruhe) wachsen gelassen. Nach viermaligem Waschen mit phosphatfreiem Grace-Medium (Grace, 1962) - jeweils versetzt mit 1% Antibiotic-Antimycotic-Solution (Gibco)- wurden die Zellkulturen in 4ml des entsprechenden Mediums und 1ml foetalem Kalbsserum (gegen steriles aqua dest. dialysiert und filtersterilisiert) unter Zusatz von 100µl ^{32}P (entsprechend 60µCi/ml Medium; NEN Chemicals, Dreieichenhain; 285Ci/mg Phosphat) 5 Tage bei 21 bis 22°C gehalten. Nach drei- bis vierstündigem Chase mit tracerfreiem Medium wurden die Zellen vom Boden der Kulturflaschen abgespritzt, in der Kühlzentrifuge pelletiert (SS 34, 0°C,

3000rpm, 10min., Sorvall RC2-B Kühlzentrifuge) und in 5ml eines Lyse-Mediums 1 bis 2h bei Zimmertemperatur lysiert. Danach wurde die Lösung viermal mit gleichem Volumen Tris/SDS-gesättigten Phenols extrahiert. Die Phasen wurden durch Zentrifugation getrennt (SS 34, 0°C, 10000rpm, 10min.). Nach Fällung mit Kaliumacetat und Äthanol wurde die RNA in einem 5 bis 50% Saccharosegradienten gereinigt und aufgetrennt (siehe 8.1.1.). Die Fraktionen, die 18S bzw. 28S rRNA enthielten, wurden vereinigt, gefällt und erneut über Saccharosegradienten gereinigt.

8.2. Nick-Translation

8.2.1. Radioaktive Markierung der rDNA-Clone

Zur Lokalisation der Nukleolenbildungsorte wurde clonierte rDNA von D. melanogaster verwendet. Der geclonte Plasmid pDm103, der eine vollständige rDNA-Einheit mit einer 5kb-Insertion enthält (Glover und Hogness, 1977), wurde mir von M. Rosbash (Waltham, MA) zur Verfügung gestellt. Den Clon pDmre60 (eine rDNA-Einheit ohne Insertion, I.B. Dawid, pers. Mitteilung) erhielt ich von I.B. Dawid (Baltimore, MD). Die radioaktive Markierung dieser clonierten rDNA wurde mittels Nick-Translation nach einer Darstellung von Macgregor und Mizuno (1976) vorgenommen.
Pro µg DNA wurden je $2x10^{-4}$µMol der vier ^{3}H-Desoxyribonukleosid - Triphosphate (zwischen 13 und 50Ci/mMol, NEN Chemicals) im Vakuum eingedampft. Dazu wurden 10µl der 10xSalzlösung, 1µg DNA in 10mM Tris;1mM EDTA, 2µl DNA-Polymerase I (entsprechend 10 Einheiten; Grade I, Boehringer, Mannheim), 2µl einer $1x10^{-4}$mg/ml Lösung DNase I (Sigma, München) und aqua dest. ad 100µl zugegeben. Bei einem Ansatz von mehreren µg DNA wurden entsprechend viele Portionen einzeln angesetzt, da ein Gesamtansatz die Effektivität der Reaktion sehr stark verringerte. Die Inkubation dauerte 90 min. bei 15°C und wurde durch Eiskühlung und Zugabe von 10µl 0.1M EDTA abgestoppt. Die Trennung der ^{3}H-DNA von den nicht eingebauten ^{3}H-Triphosphaten wurde durch eine selektive Fällungsmethode in Anlehnung an Maxam und Gilbert (1977)

erreicht. 20µg RNA aus Bäckerhefe pro 100µl wäßriger Phase, 0.8 Volumen 7.5M Ammoniumacetat und doppeltes Volumen 96% Äthanol wurden mit der Reaktionslösung gemischt und die DNA darin für 30min. bei-80°C gefällt. Nach Pelletierung (HB-4, 10000rpm, 10min., 0°C, Sorvall RC2-B Kühlzentrifuge) wurde das Pellet zweimal mit 0.5M Ammoniumacetat in 75% Äthanol und einmal in 96% Äthanol resuspendiert und erneut wie oben pelletiert. Nach Verdunsten des Alkohols wurde das Pellet in 100 bis 200µl aqua dest. aufgenommen. Eine Fraktionierung über eine Sephadex-Säule (G-50 fine; 25x0.9cm) zeigte keine Kontamination des Pellets mit radioaktiven Triphosphaten (Abb.2), so daß in den Folgeversuchen direkt die gefällte Probe zur in situ-Hybridisierung in aqua dest. gelöst wurde. Es wurden spezifische Aktivitäten von $7x10^6$ bis $1x10^7$dpm/µg erreicht.

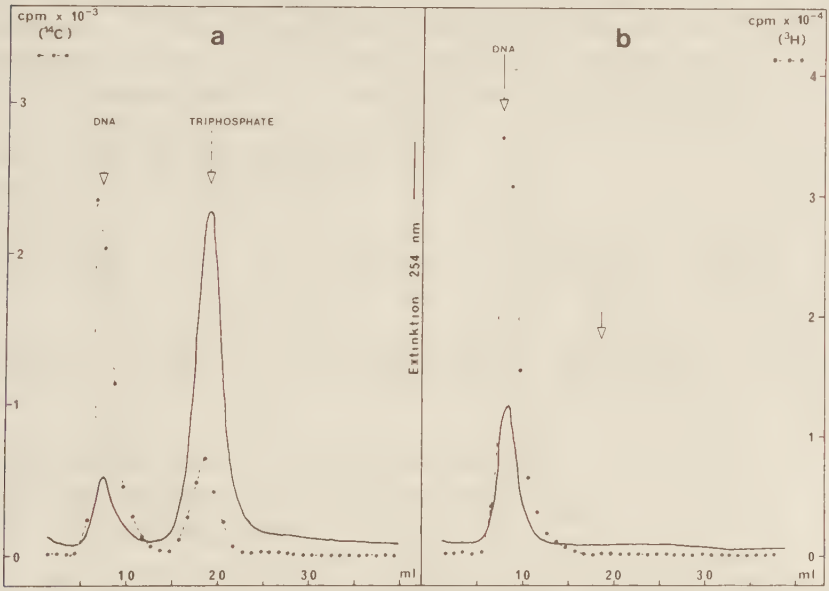


Abb.2: Elutionsprofile nick-translierter DNA-Proben (Sephadex G-50 fine in aqua dest; 20ml/h Durchflußgeschwindigkeit). 1ml-Fraktionen wurden mit dem LKB 7000 Ultrorac Fraktionenkollektor fraktioniert und das Elutionsprofil mit dem LKB 2089 Uvicord III gemessen. a) Gesamt-DNA von D. affinis, die mit ^{14}C-Vorstufen markiert und direkt auf die Säule aufgetragen wurde. b) ^{3}H-markierte pDm103-DNA, die nach der Nick-Translation selektiv gefällt und dann auf die Säule gegeben wurde.

8.2.2. ^{14}C-Markierung von Gesamt-DNA

Gesamt-DNA der verschiedenen D. affinis-Stämme wurde ebenfalls durch Nick-Translation radioaktiv markiert. Als radioaktive Vorstufe wurde Desoxy- [-U-^{14}C]-ATP eingesetzt (476mCi/mMol, Amersham-Buchler). Um längere DNA-Moleküle zu erhalten, wurde die Reaktion in folgenden Punkten abgeändert:

- Es wurde keine DNase I zugesetzt, da DNase-Aktivitäten bereits als Verunreinigung im Polymerase-Präparat enthalten sind.
- Die Reaktion wurde bei 6°C eine Stunde ausgeführt.
- In einem Ansatz wurden bis zu 40µg DNA mit 8 Einheiten DNA-Polymerase behandelt.

Nach beendeter Reaktion wurde die Lösung dreimal mit gleichem Volumen aqua dest. gesättigten Phenols extrahiert und die DNA gefällt (siehe 8.2.1. , ohne Zusatz von carrier-tRNA). Die DNA-Menge wurde dann in 0.1xSSC aufgrund ihrer Hyperchromizität errechnet $\left(\frac{OD_{100} - OD_{25}}{OD_{25}} = 0.4 \triangleq 50\mu g/ml \text{ doppelsträngige DNA} \right)$.

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde ein Aliquot in 5% wäßrigem Unisolve im Packard Tri-carb Scintillation Spectrometer C2425 gemessen.

8.3. Jodinierung der durch Komplexierung gewonnenen DNA-Fraktionen

Die Jodinierung nach Commerford (1971) wurde mit den Verbesserungen von Altenburg et al. (1975) und Prensky (1976) durchgeführt. Alle Arbeiten geschahen innerhalb eines Abzuges mit Bleischutz.

5µl einer Ansäuerungslösung wurden mit 2µl Na^{125}J (17Ci/mg, 10mCi in 0.0235ml NEN Chemicals) vermischt, in eine ausgezogene 20µl Kapillare aufgenommen und 30 min. bei Zimmertemperatur belassen. 5µl DNA-Lösung (zwischen 0.5 und 2µg in aqua dest.) wurden bei 70°C 5 min. denaturiert und danach mit 5µl $TlCl_3$-Lösung in eine Eppendorfspitze pipettiert. Die Spitze wurde auf eine gedrückte 100µl Eppen-

dorfspitze gesetzt und der Inhalt der Kapillare aufgesaugt. Durch mehrfaches Leeren des Inhalts auf ein Parafilmstück wurden die Lösungen gemischt. Die Mischung wurde wieder in die Kapillare gesogen; die Kapillare wurde zugeschmolzen, bei 70°C 30min. lang inkubiert und danach 20min. im Eisbad gekühlt. Das Reaktionsgemisch wurde nun auf eine Hydroxylapatitsäule (Bio-Rad; 1x0.5 cm in 0.05M Phosphatpuffer) aufgetragen und mit 40ml 0.05M Phosphatpuffer gespült. Eluiert wurde die DNA mit 0.4M Phosphatpuffer. Der erste Milliliter (= DNA-Fraktion) wurde 20min. bei 60°C erhitzt und nach Erniedrigung der Molarität auf 0.05M erneut über eine Hydroxylapatitsäule von uneingebauter Radioaktivität gereinigt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Packard Auto-Gamma Spectrometer 5110 in wäßriger Lösung. Die Radioaktivität der Gesamtfraktion lag zwischen $3x10^5$ und $3x10^6$cpm. Nach Zugabe von 200µg tRNA (E. coli; Boehringer, Mannheim) wurden die Fraktionen gegen destilliertes Wasser dialysiert und eingedampft.

9. Filtersättigungshybridisierungen

Es wurden in verschiedenen Experimenten 5 bis 10µg DNA pro Filter eingesetzt. Zur Kontrolle der "Background"-Hybridisierung wurden stets mehrere Filter mit gleicher Menge Micrococcus lysodeikticus-DNA (Miles) beladen und mithybridisiert. Die DNA wurde in 0.33N NaOH für 90 min. bei 37°C denaturiert, auf 6xSSC gebracht und mit 1N HCl neutralisiert. Die Proben wurden auf einem Millipore-Vielfachfiltrationsgerät 3025 auf Nitrozellulosefilter (Schleicher und Schüll; Ø 25mm; 0.45µm Porengröße) aufgetragen und mit 6xSSC (5ml) nachgespült. Die Filter wurden danach 2h bei Zimmertemperatur und 12h bei 80°C im Vakuumschrank getrocknet. Die Hybridisierung wurde in 6xSSC/50% Formamid bei 40°C durchgeführt. Das Sättigungsplateau wurde mit 28S rRNA-Konzentrationen von 0.4 bis 20µg/ml in einem Volumen von 3ml bei 12 bis 14 Filtern ermittelt. Als Kompetitor wurde stets kleinmolekulare RNA (4S und 5S) aus Bäckerhefe (20µg/ml; Boehringer, Mannheim) zugegeben. Nach der Hybridisierung wurden die Filter fünfmal je 10min. in 2xSSC (200ml)

bei Zimmertemperatur gewaschen, 1h bei 37°C mit RNase A (20µg/ml in einem Volumen von 25ml; Boehringer, Mannheim) inkubiert und erneut fünfmal gewaschen wie vor der Inkubation. Nach kurzem Spülen in 70% Äthanol wurden die Filter bei Zimmertemperatur getrocknet, über Nacht in 10ml Unisolve (5% an aqua dest.) gelöst und im Packard Flüssigkeits-szintillationszähler gezählt.

In den Fällen, in denen ^{14}C-nick-translierte DNA auf die Filter aufgetragen worden war - zur Bestimmung des DNA-Verlustes - wurden die Filter nach Trocknung im Packard Tri-carb Oxidizer verbrannt und die ^{14}C- und ^{3}H-dpm im Szintillationszähler ermittelt.

10. In situ-Hybridisierungen

10.1. Herstellung von Mitosechromosomenpräparaten

Mitosepräparate wurden nach der Methode von Holmquist (1975) hergestellt. Ganglien aus männlichen Larven des späten dritten Stadiums wurden in 1% Natriumcitrat präpariert und 10min. darin quellen lassen. Nach Fixierung in 3:1 Methanol: Eisessig für dreimal 10min. wurden die Ganglien auf einen Objektträger (Chromschwefelsäure-gewaschen und Chromalaun-Gelatine-beschichtet) in 25µl 60% Essigsäure überführt. Der Objektträger wurde auf einer Heizplatte auf 50°C gehalten. Nach ca. 1min. wurde das mazerierte Gewebe durch Verkanten des Objektträgers über einen breiten Bereich verteilt. Mit einem Spritzer 3:1 Fixans wurde nochmals nachfixiert und das Präparat luftgetrocknet.

10.2. Hybridisierungen

10.2.1. Hybridisierung mit rDNA-Clonen

Die in situ-Hybridisierungen wurden nach den Angaben von Pardue und Gall (1975) durchgeführt. Die Präparate wurden zunächst in 2xSSC bei 70°C 30min. inkubiert, was zu einer besseren Haftung des Gewebes führen soll (Bonner und Pardue, 1976). Nach zweifachem Spülen in 70% und 96% Äthanol (je 10min. bei Zimmertemperatur) wurden die Prä-

parate luftgetrocknet. Zur RNase-Behandlung wurden 200µl einer RNase-Lösung (100µg/ml RNase A in 2xSSC) auf jedes Präparat pipettiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Inkubation erfolgte in feuchten Kammern bei 37°C für 1h. Nach Waschen in 2xSSC (dreimal à 5min.) und in 70% und 96% Äthanol (je 5min.) wurden die Objektträger erneut luftgetrocknet. Der Denaturierung der Chromosomen (0.07M NaOH; 3min.; Zimmertemperatur) wurden wiederum Alkoholwaschungen (zweimal 70% und zweimal 96% Äthanol; jeweils 5min.) und Lufttrocknung angeschlossen. Die Lösung mit der nick-translierten DNA wurde in 0.1M NaOH (Endkonzentration) bei Zimmertemperatur zur Denaturierung der DNA 15min. inkubiert, eisgekühlt, mit 1M HCl neutralisiert und auf 2xSSC gebracht; 30µl der Lösung mit jeweils 0.05µg DNA wurden auf jedes Präparat gegeben und mit einem Deckglas (18x18mm) bedeckt. Es wurde bei 68°C 14h in feuchten Kammern hybridisiert. Dem Abschwemmen der Deckgläser in 2xSSC bei 60°C schlossen sich folgende Schritte (jeweils 5min.) an: dreimal 2xSSC bei 60°C, zweimal 2xSSC bei Zimmertemperatur, zweimal 70% und einmal 96% Äthanol.

10.2.2. In situ-Hybridisierung mit jodinierten DNA-Fraktionen

Bei den in situ-Hybridisierungen mit jodinierten DNA-Fraktionen wurde abweichend von den Versuchen unter 10.2.1. folgendermaßen verfahren (Hennen et al., 1975):

Die denaturierten DNA-Proben (0.5 bis $3x10^5$cpm; bis zu 1µg pro Fraktion) wurden in einem Gesamtvolumen von 300 bis 400µl auf folgende Endkonzentrationen gebracht: 0.1M KJ, 4xSSC und 50% v/v Formamid. 60 bzw. 80µl dieser Mischung wurden auf die Präparate aufpipettiert und mit einem Deckglas (22x22mm) bedeckt. Die Hybridisierung erfolgte in feuchten Kammern (4xSSC; 0.1M KJ; 50% v/v Formamid) bei 37°C 20 bis 24h. Anschließend wurden die Objektträger für jeweils 5min. wie folgt behandelt: dreimal in 2xSSC (Zimmertemperatur), dreimal in 2xSSC (60°C), 2xSSC (Zimmertemperatur), 5% w/v Trichloressigsäure (4-5°C), dreimal 70% Äthanol und zweimal 96% Äthanol.

10.3. Autoradiographie

Die Präparate wurden in Kodak NTB-Lösung (1:1 mit aqua dest. gemischt) bei 42°C getaucht und 10 bis 40 Tage bei 4°C exponiert. Die Autoradiographien wurden in Kodak D19 entwickelt (2min.), zwischengewässert (20sec.), fixiert (Agfa Acidofix; 15min.) und für 30min. gewässert. Die Färbung erfolgte mit Gurr's Giemsa-Lösung (1:20) in 0.01M Phosphatpuffer eine Stunde lang.

11. Restriktionsanalysen

11.1. Restriktionsenzyme und Inkubationsbedingungen

Die verwendeten DNA-Proben hatten stets einen Reinheitsgrad von mindestens 33% Hyperchromizität und eine Konzentration von mindestens 100µg/ml.

Zur Verdauung von 2µg DNA wurden 50 Einheiten Eco RI (1:20 verdünnt; Boehringer, Mannheim) in einem Volumen von 50µl Reaktionspuffer für 15min. bei 37°C eingesetzt. Die Reaktion wurde beendet durch 10µl Stop-Lösung (Lösungen nach den Angaben von Boehringer).

Zur Analyse der Restriktion mit HindIII wurden 20 Einheiten (New England Biolabs, Beverly U.S.A.) pro 2µg DNA im gleichen Reaktionspuffer wie für Eco RI bei gleichen Bedingungen inkubiert. Die Reaktion wurde auch mit der gleichen Lösung beendet.

Die Reaktion mit der Restriktionsendonuklease Bam HI (Boehringer) wurde ebenfalls unter den gleichen Bedingungen wie für Eco RI durchgeführt; es wurden 24 Einheiten des Enzyms für 2µg DNA eingesetzt.

Die Restriktion mit HaeIII (New England Biolabs) wurde gleichfalls 15min. bei 37°C durchgeführt (Puffer siehe 2.). 20 Einheiten verdauten 2µg DNA unter diesen Bedingungen. Die Reaktion wurde beendet durch Zugabe von 10µl 40% Saccharose und 0.5M EDTA (Na_4) (Shen *et al.*, 1976).

Wurden Restriktionsanalysen nach der Verdauung mit zwei Enzymen unternommen, so wurde zunächst 15min. die Reaktion mit einem Enzym durchgeführt, danach erst das

zweite Enzym zugesetzt und weitere 15min. inkubiert.

11.2. Elektrophoretische Auftrennung der Restriktionsfragmente

Die verdauten DNA-Proben wurden auf einem Agarose-Flachgel (die Agarose-Konzentrationen sind in den Abbildungen angegeben) in Tris/Acetat-Puffer aufgetrennt. Dem Puffer (nach Hayward und Smith, 1972) wurden 0.5µg/ml Ethidiumbromid zugegeben (Sharp et al., 1973). Die Elektrophorese wurde in einer von Sugden et al. (1975) beschriebenen Slab-Gel-Apparatur (Blair Craft, Cold Spring Harbor, U.S.A.) durchgeführt (40mA, 5h). Der Lauf wurde anhand der Ethidiumbromidfluoreszenz auf dem Transilluminator C-62 (Ultra-Violet Products Inc., San Gabriel, Kalifornien) kontrolliert und mit einer Polaroid-Kamera (MP-4; Polaroid-Film 665 Positiv/Negativ; Rotfilter: Kodak Gelatine Filter No. 23A) dokumentiert.

11.3. Southern-Transfer

Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden im Gel in 300ml Denaturierungslösung 30min. denaturiert. Nach Neutralisation (15min.; ebenfalls 300ml) wurde das Gel auf Filterpapier (mit 20xSSC befeuchtet) gelegt. In der von Southern (1975) beschriebenen Weise wurde die DNA im Laufe von 12 bis 15h auf einen Nitrozellulosefilterbogen transferiert (Membranfilter SM 113 25; 0.45µm Porengröße; Sartorius, Göttingen). Der Filterbogen wurde zuvor 1h in 10xSSC und 1h in 2xSSC gewaschen. Nach Entfernung der Nachsaugflüssigkeit (20xSSC) wurde das Gel 1 bis 2h ans Nitrozellulosefilter angetrocknet. Danach war die Ethidiumbromidfluoreszenz vom Gel auf das Filter übergegangen, der Transfer also vollständig erfolgt.

11.4. Hybridisierung

Der Nitrozellulosebogen wurde so in Streifen geschnitten, daß an jedem Streifen die aufgetrennte DNA eines Probenschachtes gebunden war. Jeder Nitrozellulosestreifen wurde

mit 200µl 6xSSC/50% Formamid befeuchtet, in den von Southern (1975) beschriebenen Hybridisierungstrog gelegt und mit 100µl RNA-Lösung benetzt (RNA-Lösung: 1µg ^{32}P-rRNA (spez. Akt. 10^5cpm); 2µg tRNA - aus E. coli, Boehringer - in 6xSSC/50% Formamid. Im Falle der 18S rRNA wurde außerdem 1µg unmarkierte 28S rRNA als Kompetitor zugesetzt). In einem Trog wurden bis zu 10 Filterstreifen übereinander hybridisiert. Der Trog wurde mit Vaseline abgedichtet und mit einem Deckel verschlossen. Die Hybridisierungsbedingungen und nachfolgenden Waschungen waren dieselben wie bei der Filtersättigungshybridisierung (9.). Es wurde stets in sehr großen Volumina gearbeitet (500ml auf 20 Filterstreifen) und die Filter vor dem Trocknen zwischen trockenen Filterlagen fest gepresst, um überschüssige radioaktive Lösung zu entfernen.

Jodinierte DNA-Fraktionen wurden nach der von Dawid (1977) beschriebenen Methode über elektrophoretisch aufgetrennte Restriktionsfragmente hybridisiert. Bis zu 1µg hitzedenaturierter DNA (5min.; 100°C; 1 bis $3x10^5$cpm) wurden in 400µl Hybridisierungslösung über zwei Nitrozellulosefilterstreifen verteilt und 22h bei 37°C inkubiert. Die Filterstreifen wurden in folgenden Lösungen jeweils für 15min. bei Zimmertemperatur gewaschen: viermal 2xSSC/50% v/v Formamid, sechsmal 2xSSC.

11.5. Autoradiographie

Zur Autoradiographie wurde Kodak Royal X-omat Röntgenfilm benutzt. Zwischen Metallplatten wurden zwei Röntgenfilme auf die Filterstreifen gepreßt, so daß ein Film zu einer Testentwicklung benutzt werden konnte. Nach Expositionszeiten von 10 bis 30 Tagen wurden die Filme wie die in situ-Präparate entwickelt (Kodak D19 2min., 20sec. zwischenwässern; 15min. Agfa Acidofix; 30min. wässern).

In einigen Experimenten wurde die Expositionszeit sehr stark durch die Benutzung einer Verstärkerfolie (Cronex Quanta II; Firma Du Pont de Nemours) verkürzt (20 bis 80h bei -80°C; Swanstrom und Shank, 1978).

III Ergebnisse

1. Zytologische Beobachtungen

1.1. Spermatozytenkerne

D. affinis hat im Vergleich zu D. hydei ausgesprochen kleine Spermatozytenkerne. Während in den Spermatozytenkernen von D. hydei schleifenartige Strukturen deutlich erkennbar sind, findet man in den Kernen von D. affinis nur ein Feld aus granulärem Material, das nicht erkennbar schleifenartig angeordnet ist (siehe Abb.3; vgl. auch Hess, 1967).

Ausdehnung und Erscheinungsform dieses granulären Materials sind in den beiden untersuchten Genotypen - Y^L und Y^O - in keiner Weise unterschiedlich. Man muß daraus folgern, daß das Material nicht oder zumindest nicht nur vom Y-Chromosom aus entsteht. Eine variierende Ausdehnung innerhalb des Kerns - in manchen Spermatozyten sind nur einzelne Schollen vorhanden, in anderen ist der Kern von diesem Material fast ausgefüllt - wird ebenfalls in beiden Genotypen beobachtet und scheint eher verschiedene Aktivitätszustände darzustellen.

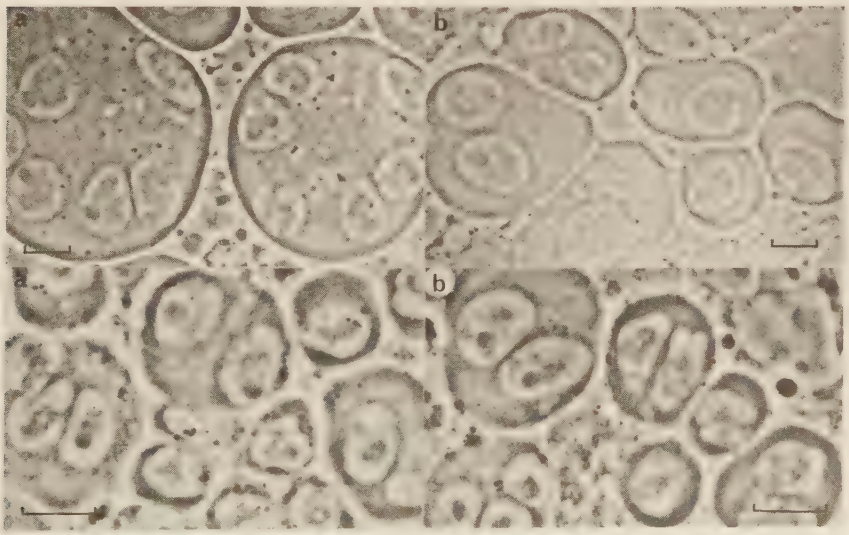


Abb.3: Primäre Spermatozytenkerne aus (a) Y^L- und (b) Y^O-♂♂ von D. affinis. Der Strich in den Abbildungen entspricht 5µm.

1.2. Spermienlänge

Bei D. hydei und D. melanogaster wurde festgestellt, daß die Spermienlänge bei Tieren mit zwei Y-Chromosomen doppelt so groß ist wie bei X/Y-♂♂ (Hess und Meyer, 1963). Würde also das Y^L-♂ über zwei Sätze an Fertilitätsfaktoren - einen auf dem Y^L und einen anderswo im Genom lokalisierten - verfügen, so wäre eine Längendifferenz zwischen den Spermien beider Stämme zu erwarten. Dies ist jedoch nicht der Fall; denn in beiden Genotypen wurde eine Spermienlänge von etwa 0.26mm gemessen (siehe Tab.1).

Genotyp	Anzahl Messungen	Mittelwert ± Standardabweichung
Y^0	22	0.268 ± 0.021mm
Y^L	28	0.259 ± 0.019mm

Tabelle 1: Spermienmessungen an Y^0- und Y^L-♂♂ von D. affinis.

2. DNA-Analysen

2.1. Isopyknische CsCl-Gradientenzentrifugation

Die DNA der ♂♂ und ♀♀ aller hier verwendeten D. affinis-Stämme wurde in der Analytischen Ultrazentrifuge in neutralem CsCl zentrifugiert, um eventuell in Abhängigkeit vom Y-Chromosom vorhandene Satellitenkomponenten zu finden. Alle Genotypen zeigten nur eine einheitlich bandierende Hauptbande mit einer Dichte von 1.703g/cm^3 (errechnet mit Micrococcus lysodeikticus, ϱ = 1.731g/cm^3, als Marker; siehe Abb.4). Die auf der leichten Seite sichtbare Schulter stellt wahrscheinlich mitochondrielle DNA dar, da ihre Menge je nach Ausmaß der zytoplasmatischen Kontamination wechselt,und ihre Dichte der Mitochondrien-DNA von verwandten Drosophila-Arten entspricht (z.B. D. melanogaster ϱ= 1.682g/cm^3; Bultman et al., 1976).

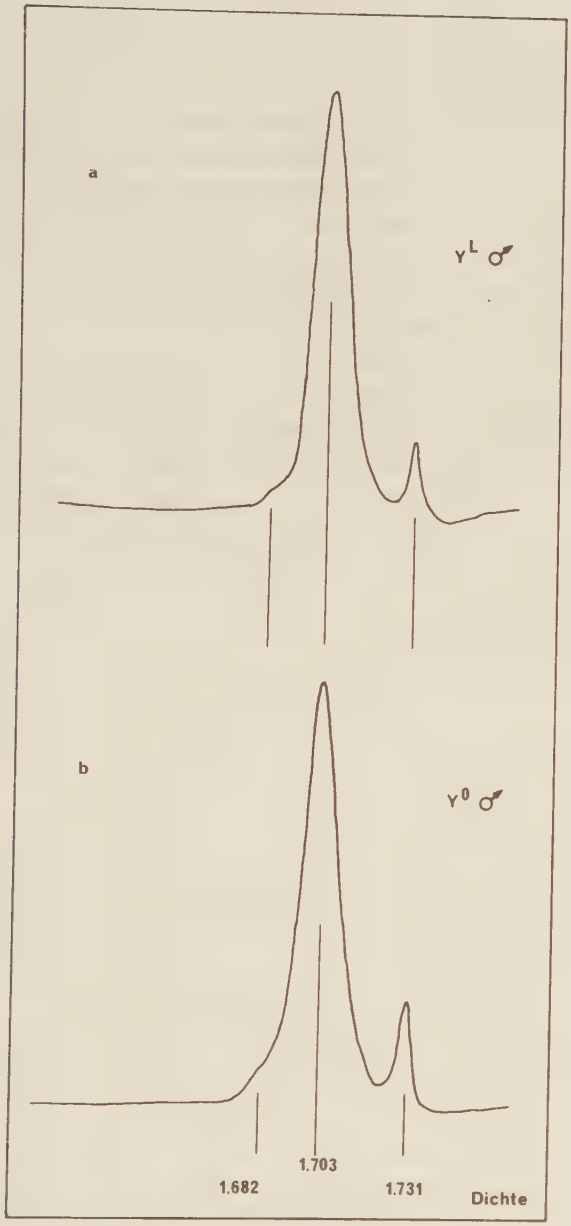


Abb. 4: Bandierungsprofile von D. affinis-DNA nach Zentrifugation in CsCl in der Analytischen Ultrazentrifuge. Als Beispiele sind Y^L♂♂ (a) und Y^0♂♂ (b) gezeigt. Der verwendete Marker ist Micrococcus lysodeikticus (1.731g/cm^3).

2.2. Schmelzanalysen

Satellitensequenzen haben aufgrund ihrer kurzen Grundsequenz eine einheitliche Basenzusammensetzung und schmelzen daher in einem kleinen Temperaturintervall. Dies bewirkt einen steilen Schmelzbereich, der sich in seiner Steigung von der Schmelzkurve der übrigen DNA absetzt. Satellitenfraktionen sind damit durch eine definierte Schmelztemperatur charakterisiert.

Um Satellitenfraktionen bei D. affinis zu finden, und um eventuell vorhandene Unterschiede zwischen den Genotypen daran zu erkennen, wurden von der DNA aus ♂♂ und ♀♀ der drei verschiedenen Stämme Schmelzkurven angefertigt. Jedoch waren selbst unter optimalen Bedingungen

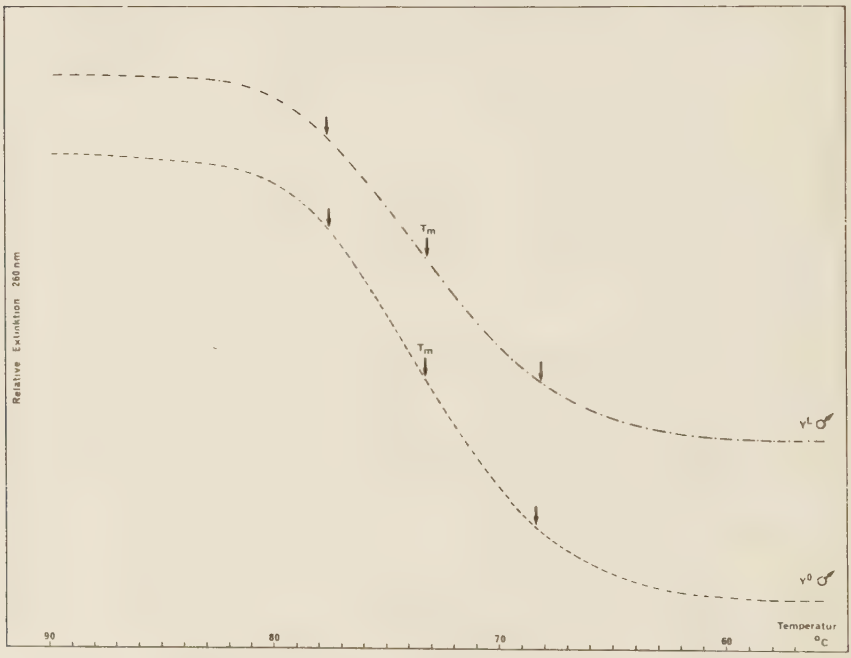


Abb. 5: Thermische Denaturierung von D. affinis-Gesamt-DNA. Es werden Y^L-♂♂ mit Y^0-♂♂ verglichen. Die Pfeile begrenzen den Bereich $T_m \pm 2\sigma$ der beiden Schmelzkurven.

(hohe DNA-Konzentration, geringe Aufheizrate) keine Unterschiede feststellbar. Das gesamte Genom schmilzt über einen Temperaturbereich (2σ) von 9.3°C einheitlich, soweit man das aus Versuchen mit Gesamt-DNA schließen kann. Der T_m-Wert beträgt bei allen Genotypen 73.2°C in 0.1xSSC (Abb.5).

3. Differentielle Zentrifugation

3.1. Komplexierung mit Silberionen

Zunächst wurde das Bindungsverhalten der D. affinis Y^L-♂♂-DNA nach Komplexierung mit Silber zu verschiedenen Bindungsverhältnissen analytisch untersucht (siehe Abb.6).

Bei einem Rf-Wert von 0.1 bleibt die DNA recht einheitlich in einer scharfen Bande (Abb.6a).

Eine Erhöhung auf Rf = 0.2 bewirkt die Abtrennung eines kleinen Satelliten auf der schweren Seite, zu dem hin die Hauptbande sehr heterogen abfällt. Eine deutliche Schulter hebt sich auf der leichten Seite der Hauptbande ab (Abb.6b).

Die größte Anzahl an Einzelfraktionen werden bei Bindungsverhältnissen von Rf = 0.40 bis 0.45 sichtbar (Abb.6d; e); während die Hauptbande bei Erhöhung der Silberkonzentration zur schweren Seite abwandert, bleiben - je nach Qualität der Auftrennung - ein bis zwei Komponenten auf der leichten Seite liegen. Die Hauptbande scheint noch weitere Komponenten zu enthalten, da auf beiden Seiten Schultern (Pfeile in Abb.6d; e) sichtbar sind. Auch bei diesen Rf-Werten liegt eine abtrennbare Fraktion auf der schweren Seite.

In präparativen Ag^+/Cs_2SO_4-Gradienten wurde das Bandierungsprofil von Y^L-♂♂ mit dem von Y-freien Tieren verglichen. Als Tiere ohne Y wurden Y^S-♀♀ und Y^O-♂♂ genommen (siehe Abb.7a; b).

Das Komplexierungsverhalten der DNA in präparativen Gradienten (Abb.7a) ist im Vergleich zu den analytischen Profilen (Abb.6c; d; e) etwas verändert. Zum einen entspricht das Bandierungsprofil in allen Versuchen bei einem Rf = 0.3 in der präparativen Ultrazentrifuge (Abb.7a) dem, was in der Analytischen Ultrazentrifuge bei 0.4 bis 0.45 (Abb.6d; e) erreicht wird, wenn man von der Auflö-

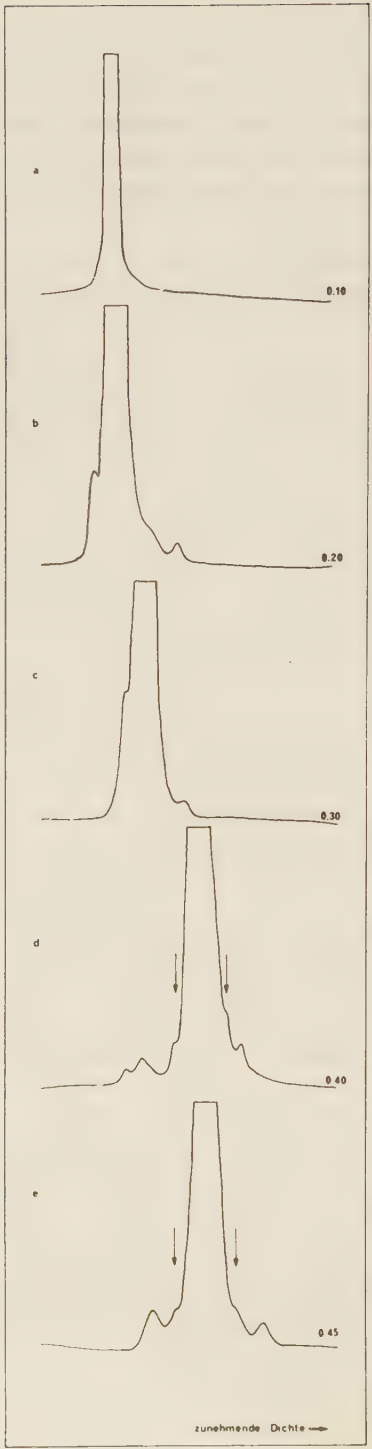


Abb.6: Bandierungsprofile von Y^L-ôô-DNA nach Komplexierung mit Ag^+ und Zentrifugation in Cs_2SO_4-Gradienten in der Analytischen Ultrazentrifuge. Die Rf-Werte sind angegeben. Zur besseren Darstellung geringerer Komponenten wurde der Absorptionsbereich so gewählt, daß die Hauptbande nicht vollständig erfaßt werden konnte.

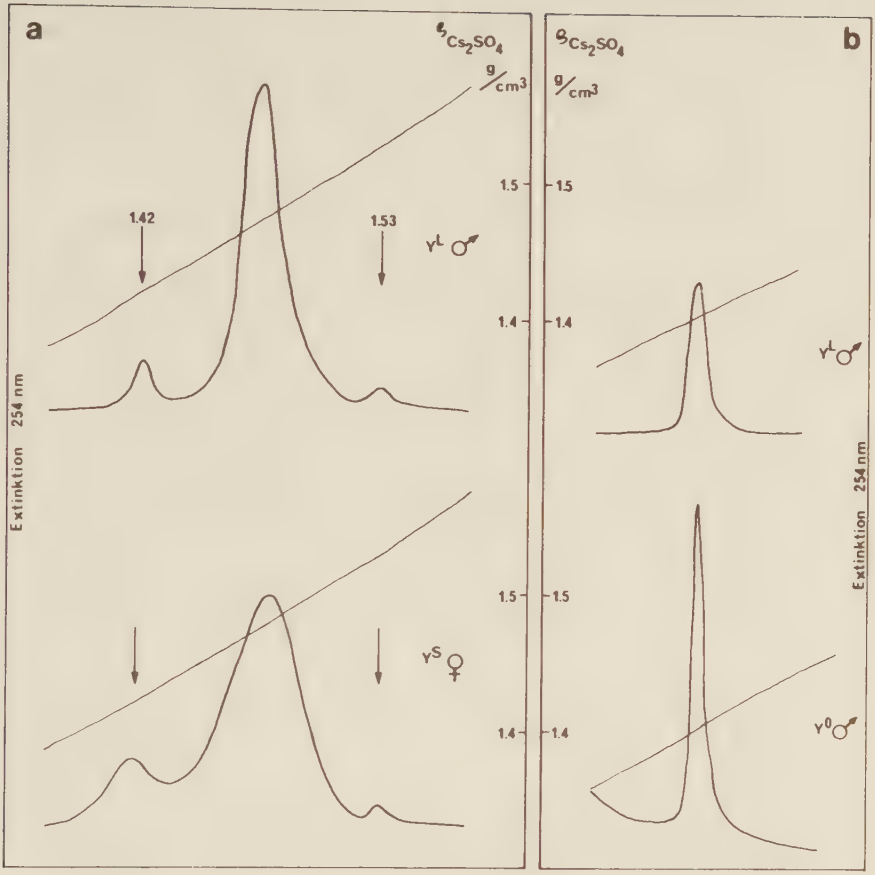


Abb.7: Vergleich des Bandierungsmusters von D. affinis-Genotypen mit Y-Chromosom und solchen, die kein Y-Chromosom tragen. Die DNA wurde mit Ag^+ zu einem Rf-Wert von 0.3 komplexiert und in Cs_2SO_4 zentrifugiert.
a) Vergleich der Gesamt-DNA von Y^L-♂♂ und Y^S-♀♀
Der geringe Anteil der Komponente bei $\varrho_1 = 1.42 g/cm^3$ im Y^L-♂♂-Gradienten erklärt sich dadurch, daß aus diesem Gradienten die 1.42-Komponente zum Teil präparativ entfernt wurde (siehe Abb.7b).
b) Vergleich der aus Y^L-♂♂ und Y^0-♂♂ isolierten 1.42-Komponente

sung der leichten Komponente absieht. Zum anderen scheint der Anteil der leichten Komponente (ϱ = 1.42g/cm^3) in den präparativen Gradienten größer zu sein. Das etwas veränderte Komplexierungsverhalten der DNA im Vergleich zu der analytischen Testreihe ist wohl durch das andersartige Volumen und die damit veränderte Konzentration des Komplexanden im Gradienten zu erklären.

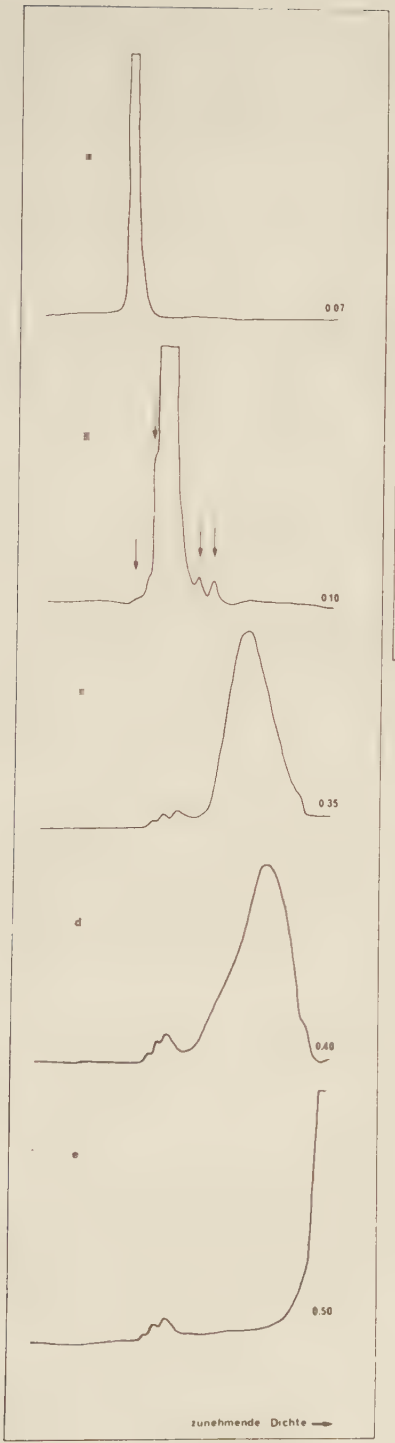
Die leichte Komponente der Dichte 1.42g/cm^3 hat offensichtlich kein Silber gebunden, da dies die Bandierungsdichte von DNA in silberfreiem Cs_2SO_4 ist. Dieses Material findet sich in allen Profilen in etwa entsprechender Menge wieder, so daß nicht zu erwarten ist, daß es sich hier um eine Fraktion mit einem hohen oder gar überwiegenden Anteil an Y-spezifischen Sequenzen handelt (Abb.7a; b). Die schwere Komponente bandiert bei einer Dichte von 1.53g/cm^3 (vgl. Abb.7a). Sie stellt einen bedeutend geringeren Prozentsatz der Gesamt-DNA dar als die leichte Komponente. Auch hier ist keine Abhängigkeit vom Vorhandensein eines Y-Chromosoms zu erkennen.

Die Dichtebestimmungen erfolgten durch refraktometrische Messung des Brechungsindexes und Umrechnung nach der für reines Cs_2SO_4 gegebenen Formel von Vinograd und Hearst (1962). Es ist nicht auszuschließen, daß die zugefügten Komplexanden einen leichten Einfluß auf den Brechungsindex haben, so daß die angegebenen Dichten von den tatsächlichen Werten etwas abweichen können.

3.2. Bandierungsverhalten der D. affinis-DNA mit Quecksilber

Bei den Versuchen mit Quecksilber wurden ebenfalls verschiedene Bindungsverhältnisse in der Analytischen Ultrazentrifuge getestet. Die meisten Versuche wurden mit Y^L-♂♂-DNA durchgeführt.

Bei einer Zugabe von Hg^{++} zu einem Rf-Wert von 0.10 werden auf der schweren Seite zwei getrennte Satellitenkomponenten deutlich, während auf der leichten Seite eine weitere Komponente nur schwach von der Hauptbande abgesetzt ist (Abb.8b).



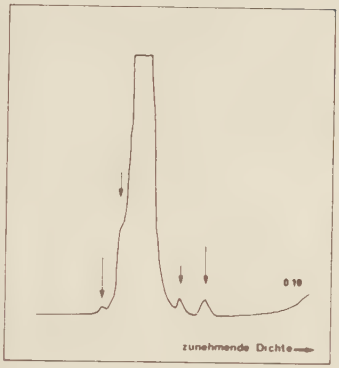


Abb.8: D. affinis Y^L-♂♂-DNA wurde zu den angegebenen Rf-Werten mit Hg^{++} komplexiert und in Cs_2SO_4-Gradienten in der Analytischen Ultrazentrifuge bandiert.
Das Profil der Y^L-♀♀-DNA zeigte bei einem Rf = 0.10 (Abb. rechts) die gleichen Komponenten wie die Y^L-♂♂-DNA (Pfeile).

Bei Rf = 0.35 und 0.40 werden auf der leichten Seite drei sehr eng beieinanderliegende Komponenten sichtbar, die, wenn überhaupt, nur wenig Quecksilber gebunden haben können, da sie an einer Dichteposition bandieren, an der die minimal komplexierte DNA bei Rf = 0.07 bandiert. Die Breite der Hauptbande bei Rf = 0.35 bis 0.40 spricht dafür, daß ihre Einzelkomponenten das Quecksilber unterschiedlich binden, jedoch ließen sich keine weiteren Komponenten abtrennen.

Ein Komplexierungsexperiment mit ♀♀-DNA bei einem Rf von 0.10 zeigt, daß die unter diesen Bedingungen bei den Y^L-♂♂ beobachteten Komponenten in gleicher Weise bei Tieren ohne Y-Chromosom auftreten (vgl. Pfeile in Abb.8).

3.3. Komplexierung mit Netropsinsulfat

D. affinis-Y^L-♂♂-DNA, die mit Netropsinsulfat komplexiert wurde, zeigte bei allen getesteten Bindungsverhältnissen ein konstantes Bandierungsprofil. Die von Matthews et al. (1978) bei Bindungsverhältnissen von 1.0 bis 5.0 noch beobachtete geringfügige Vergrößerung der Abstände zwischen den einzelnen Komponenten wurde hier nicht gefunden.

Auf der leichten Seite bandieren zwei Komponenten und eine dritte ist nur geringfügig aus der Hauptbande gelöst. Auf der schweren Seite sind zwei Komponenten dicht an der Hauptbande sichtbar und eine weitere hat soviel Netropsinsulfat gebunden, daß sie deutlich abgetrennt ist (siehe Abb.9a). Alle sechs Fraktionen finden sich in ♀♀-DNA in gleicher Weise wieder (Abb.9b).

3.4. Genomfraktionierung mit Hilfe zweier Komplexanden

3.4.1. DNA-Bindung mit Quecksilber und Netropsinsulfat

Zur feineren Fraktionierung des D. affinis-Genoms wurden zwei verschiedene Komplexierungen nacheinander angewendet. In einem ersten Experiment wurde zunächst Quecksilber in einem Bindungsverhältnis von Rf = 0.30 an die DNA gebunden. Es wurde Y^L-♂♂-DNA verwendet, die

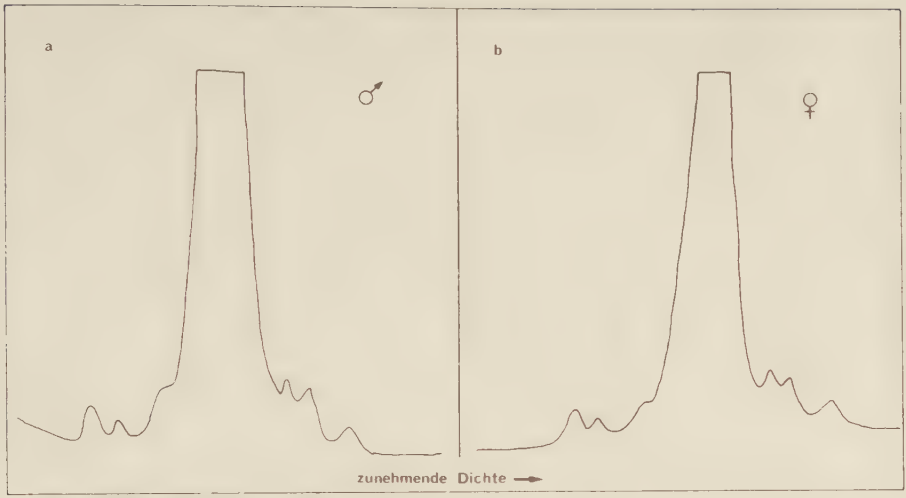


Abb.9: Bandierungsprofile von D. affinis-DNA nach Komplexierung mit Netropsinsulfat und Zentrifugation in CsCl-Cradienten in der Analytischen Ultrazentrifuge ("Rf" = 2.0). a) Y^L-♂♂-DNA; b) Y^L-♀♀-DNA

auf eine mittlere Länge von etwa $6x10^6$ Daltons geschert worden war (vgl. 6.3. in II).

Die Komponente bei der Dichte von 1.425g/cm^3 wurde im Gegensatz zum analytischen Gradienten nicht in mehrere Fraktionen zerlegt (vgl. Abb.8c und Abb.10 oben). Das schien allerdings nicht eine Folge des präparativen Trennverfahrens, sondern des Molekulargewichts zu sein, denn in einem Experiment mit ungescherter DNA (über $2x10^7$ Daltons Molekulargewicht; ermittelt im 0.7% Agarose-Gel) wurde die Auftrennung der 1.425-Fraktion in zwei Komponenten erreicht (siehe Abb.11b).

Auf der schweren Seite wurde unabhängig vom Ausgangsmolekulargewicht eine weitere Komponente von der Hauptbande abgetrennt (ϱ_1 = 1.585g/cm^3). Diese wurde in den analytischen Experimenten nicht beobachtet.

Die 1.425-Komponente (Q1) aus dem Quecksilber-Cs_2SO_4-

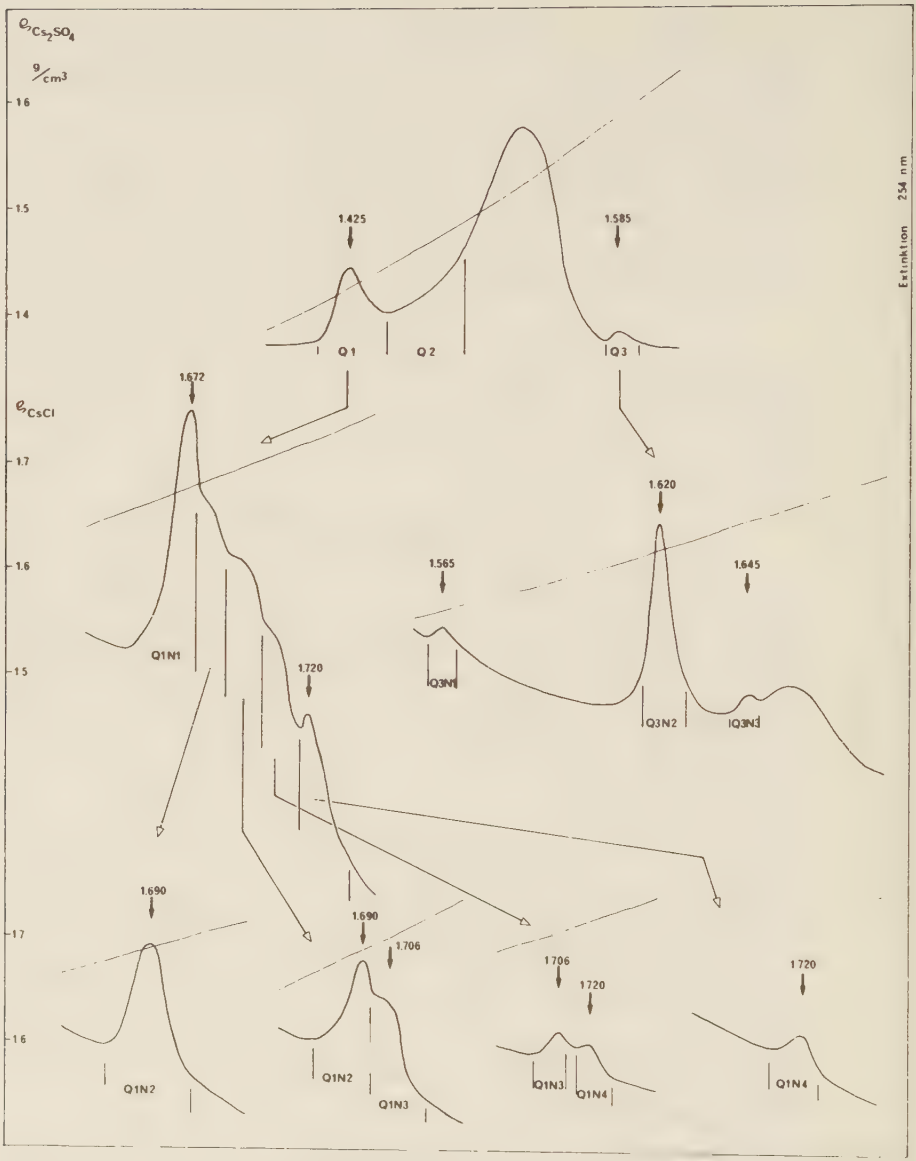


Abb.10: Mit Quecksilber (Rf = 0.30) komplexierte Y^L-$\delta\delta$-DNA wurde im Cs_2SO_4-Gradienten fraktioniert (oben). Die Komponenten Q1 und Q3 wurden mit Netropsinsulfat komplexiert und in CsCl aufgetrennt (Mitte). Vier Bereiche des heterogenen Profils der Fraktion Q1 wurden nochmals mit Netropsinsulfat komplexiert und in CsCl aufgetrennt (unten). Fraktionen gleicher Dichte wurden vereinigt.

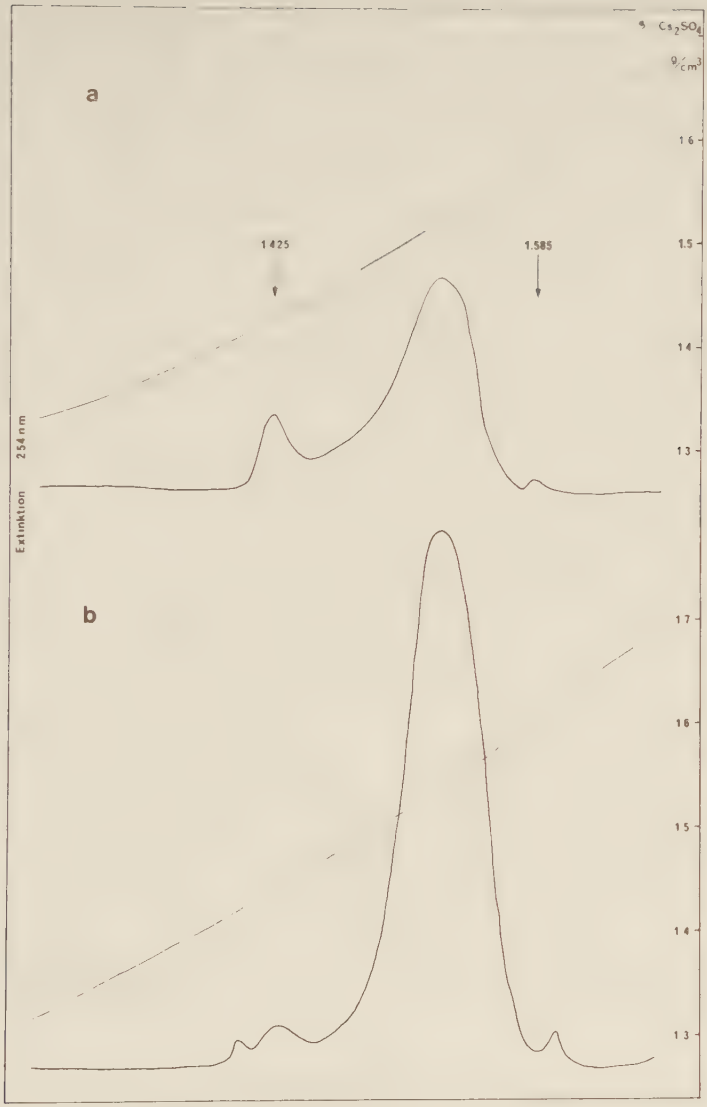


Abb.11: Bandierungsprofile von Y^L-ϑϑ-DNA nach Komplexierung mit Quecksilber (Rf = 0.30) und Zentrifugation in Cs_2SO_4. a) Molekulargewicht etwa $6x10^6$ Daltons; b) Molekulargewicht über 10^7 Daltons

Gradienten (Abb.10 oben) ergab bei anschließender Komplexierung mit Netropsinsulfat (Abb.10 Mitte) ein heterogenes Profil mit mehreren nur undeutlich getrennten Komponenten in einem Dichtebereich von 1.672 bis 1.720 g/cm^3. Die einzelnen mutmaßlichen Komponenten dieses Bandierungsprofils - mit Ausnahme der Komponente 1.672 - wurden gesammelt, erneut mit Netropsinsulfat komplexiert und in CsCl zentrifugiert (Abb.10 unten). Auf diese Weise konnten vier Fraktionen isoliert werden. Die Hauptmenge der DNA bandierte bereits im ersten Netropsin-CsCl-Gradienten bei 1.672g/cm^3 (Abb.10 Mitte), während die anderen erst in der zweiten Netropsin-CsCl-Zentrifugation isoliert wurden (Abb.10 unten). Ihre Dichten sind: 1.690, 1.706 und 1.720g/cm^3.

Der sehr breit bandierende Hauptbandenanteil der leichten Seite der DNA in Hg^{++}/Cs_2SO_4-Gradienten (Fraktion Q2 in Abb.10 oben) wurde ebenfalls isoliert, mit Netropsinsulfat komplexiert und in CsCl zentrifugiert (Kurve nicht gezeigt). Die Bandierung im Gradienten ergab jedoch keine Aufteilung in Unterkomponenten, so daß diese Fraktion nicht weiter bearbeitet wurde.

Aus der Komponente Q3 der DNA des Hg^{++}/Cs_2SO_4-Gradienten (Abb.10 oben) wurden mit Hilfe einer Netropsinsulfat-Komplexierung drei Fraktionen unterschieden. Eine sehr leichte Fraktion bandierte bei 1.565g/cm^3; eine Komponente mit der Dichte 1.620g/cm^3 enthielt die Hauptmenge der Ausgangskomponente, geringe DNA-Anteile bandierten bei den Dichten 1.645 und 1.660g/cm^3 (Abb.10 Mitte rechts). Letztere Komponente scheint ein Hauptbandenrest zu sein, da die Hauptbande der D. affinis-DNA mit Netropsinsulfat in CsCl bei 1.658g/cm^3 bandierte (siehe Abb.13 oben).

3.4.2. DNA-Bindung mit Quecksilber und Silber

Bei einem zweiten Versuch wurde angestrebt, die bei einer Quecksilber-Komplexierung mit Rf = 0.10 entstandenen Fraktionen stärker aufzuspalten. Die unter diesen Bedingungen in Cs_2SO_4 abgetrennten Fraktionen sind so

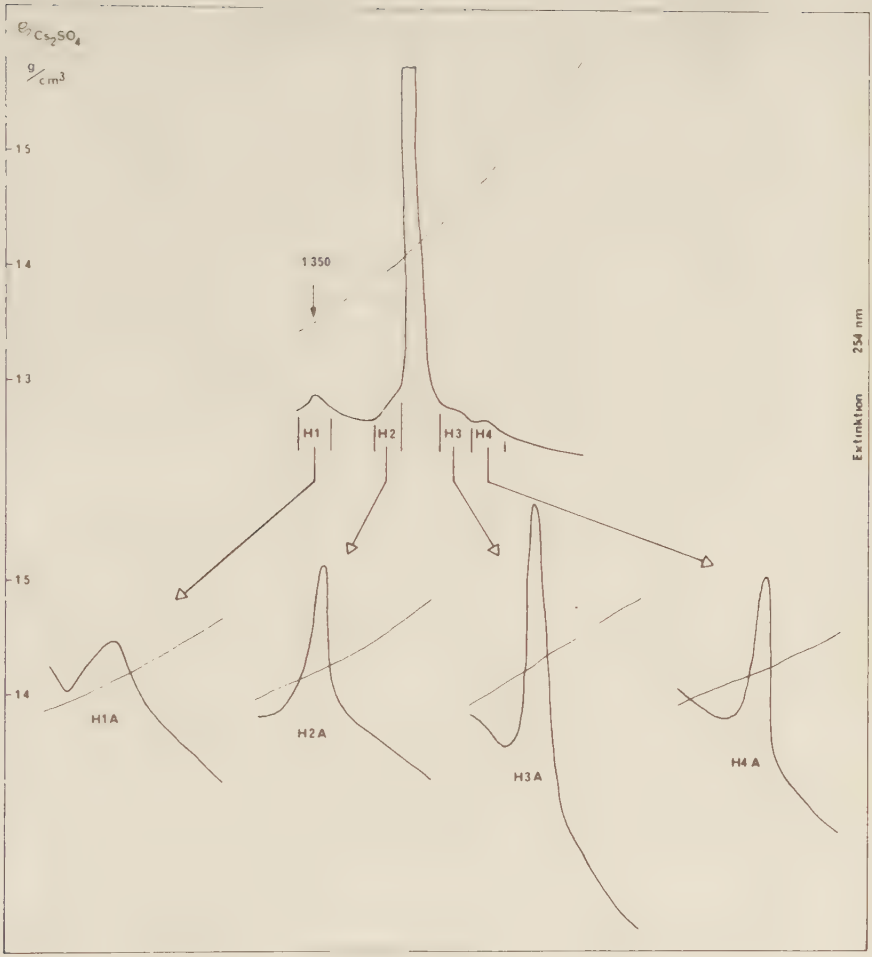


Abb.12: D. affinis-Y^L-$\delta\delta$-DNA, an die Quecksilber (Rf = 0.10) gebunden worden war, wurde fraktioniert (oben) und die einzelnen Komponenten mit Silber (Rf = 0.40) komplexiert und in Cs_2SO_4 aufgetrennt (unten).

gering (Abb.8b), daß sie im präparativen Gradienten kaum sichtbar sind, und daher wurden für die Weiterverarbeitung Fraktionen verwertet, deren Position in Analogie zu analytischen Profilen bestimmt wurde. Zusätzlich schien der Hg^{++}/Cs_2SO_4-Gradient noch eine sehr leichte Komponente zu enthalten, die in analytischen Gradienten nicht beobachtet wurde (Abb.12 oben).
Die getrennten Komponenten wurden anschließend mit Silber (Rf = 0.40) komplexiert und in einem Cs_2SO_4-Gradienten bandiert (Abb.12 unten). Alle Fraktionen ergaben unter diesen Bedingungen einheitlich erscheinende Peaks mit Ausnahme der 1.350-Komponente des Hg^{++}/Cs_2SO_4-Gradienten, die in Ag^{+}/Cs_2SO_4 etwas breiter, also wohl heterogener war. Alle Fraktionen haben aber, wenn überhaupt, nur sehr wenig Silber gebunden, da sie alle bei einer Dichte um 1.420g/cm^3 bandieren. Eine weitergehende Fraktionierung wurde nicht vorgenommen.

3.4.3. DNA-Bindung mit Netropsinsulfat und Silber

In einem weiteren Experiment wurde mit einer Netropsinsulfat-Bindung begonnen. Die Komponenten, die in dem Netropsin-CsCl-Gradienten abgetrennt werden konnten (Abb.13 oben), wurden dann einzeln mit Silber (Rf = 0.40) gebunden und in Cs_2SO_4 zentrifugiert (Abb.13 unten). Komponente N1 bandierte in Ag^{+}/Cs_2SO_4 mit einer geringfügig abgetrennten zweiten Fraktion bei Dichten, die etwa unkomplexierter DNA entsprechen (1.410 und 1.418 g/cm^3). Die beiden Fraktionen, die aus der Komponente N2 gewonnen werden konnten, sind in ihrer Dichte deutlicher unterschieden (1.395 und 1.410g/cm^3). Der heterogene Schulteranteil der Hauptbande, Fraktion N3, spaltet sogar in drei verschiedene Dichtekomponenten auf: die Hauptmenge findet sich an der leichtesten Position (ϱ = 1.415g/cm^3), und zwei kleinere Anteile bandieren bei Dichten von 1.460 und 1.660g/cm^3. Komponente N4 bandierte in einem Peak bei 1.425g/cm^3.

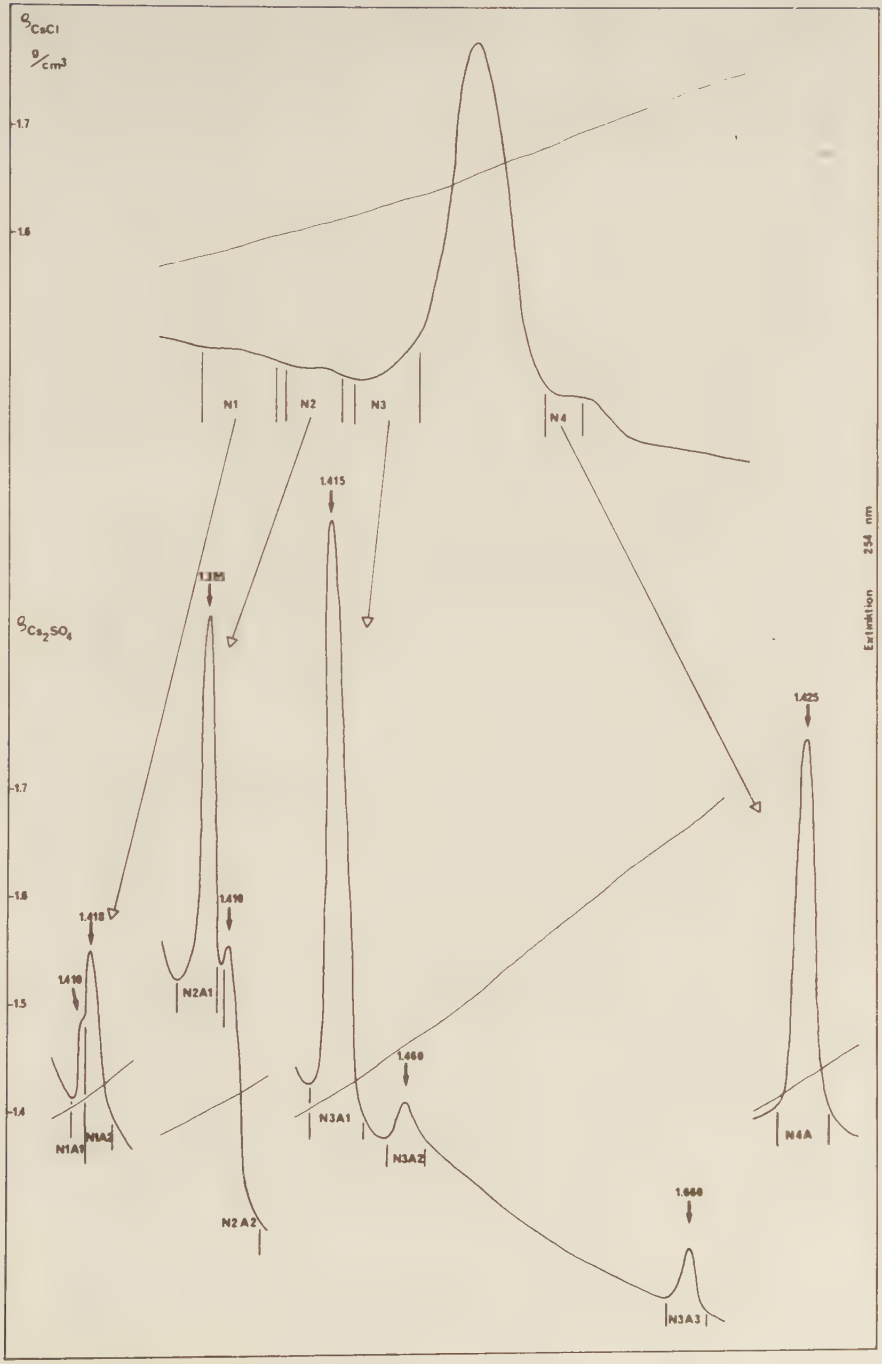

ρCsCl
g/cm³
1.7
1.6
N1
N2
N3
N4
1.415
1.425
ρCs2SO4
1.7
1.6
1.5
1.4
1.418
1.410
1.410
N2A1
1.460
N1A1
N1A2
N3A1
N3A2
N4A
N2A2
1.660
N3A3
Extinktion 254 nm

Abb.13 (S.37): An DNA aus D. affinis-Y^L-♂♂ wurde Netropsinsulfat gebunden (R_f = 2.0). Die Proben wurden in CsCl zentrifugiert (oben). Die so fraktionierten Komponenten (N1 - N4) wurden mit Silber (R_f = 0.40) komplexiert und in Cs_2SO_4 zentrifugiert (unten).

4. Versuch der Lokalisation bestimmter DNA-Fraktionen

Alle Endfraktionen der Komplexierungsversuche (siehe 3.4.1., 3.4.2. und 3.4.3.) wurden jodiniert und in situ mit den Chromosomen von D. affinis hybridisiert. Es konnte jedoch weder auf Metaphase- noch auf Polytänchromosomen eine spezifische Markierung von bestimmten Loci festgestellt werden.

Eine große Schwierigkeit bei diesen Ansätzen ist die Tatsache, daß die erhaltenen Fraktionen in ihrer Komplexität unbekannt sind. Sollte es sich um gering repetitive Sequenzen handeln, wie es nach dem breiten, homogenen Schmelzprofil der D. affinis-DNA zu erwarten ist, so ist fraglich, ob die cot-Werte (cot = Produkt aus DNA-Konzentration in Mol Nukleotiden pro Liter und der Hybridisierungsdauer in Sekunden) für eine in situ-Hybridisierung ausreichen und ob im Falle einer positiven Hybridisierungsreaktion die Radioaktivität für den autoradiographischen Nachweis genügt. Unter der Voraussetzung, daß die zur Hybridisierung verwendeten Fraktionen in sich homogen, also nicht aus verschiedenen Komponenten zusammengesetzt sind, waren bei den von mir durchgeführten Hybridisierungen die cot-Bedingungen sogar günstiger als für die rDNA, weil die Konzentration dieselbe war, die Hybridisierungszeit aber doppelt so lang gewählt wurde. Die Hybridisierungsproben waren in ihrer Radioaktivität vergleichbar, da die geringere spezifische Aktivität der Jodfraktionen durch die höhere Effizienz bei der Erzeugung von Silberkörnern ausgeglichen wurde.

Da die in situ-Hybridisierungen mit der rDNA erfolgreich waren, muß daraus der Schluß gezogen werden, daß

die jodinierten Fraktionen entweder eine geringere Komplexität als die rDNA hatten oder gleichmäßiger über das Genom verteilt waren.

Eco RI verdaute DNA aus ♂♂ der Stämme Y^L und Y^O wurde mit den Fraktionen N2A1 und N2A2 (siehe 3.4.3.) hybridisiert. In bezug auf beide Fraktionen wurde zwischen den Genotypen kein Unterschied in der Hybridisierungsreaktion gefunden.

Die Fraktion N2A1 hybridisierte hauptsächlich mit einem 4.3kb-Fragment, schwächer mit einem 3.9kb-Stück.

Fraktion N2A2 reagierte ebenfalls stark mit einem - vermutlich identischen - 4.3kb-Fragment und außerdem diffus in einem Bereich unterhalb der Wanderungsgrenze. Da die Fraktionen N2A1 und N2A2 aus ein und derselben Komponente des Netropsin-Gradienten stammen und durch die anschließende Silberkomplexierung nur unvollständig voneinander getrennt wurden, verwundert es nicht, daß sie gemeinsam mit der 4.3kb-Bande hybridisieren.

Hybridisierungen an elektrophoretisch aufgetrennten Restriktionsfragmenten haben gegenüber der *in situ*-Hybridisierung einen entscheidenden Vorteil. Während *in situ*-Hybridisierungen an diploiden Genomen nur nachweisbar sind, wenn die betreffende DNA-Sequenz an bestimmten chromosomalen Orten stark angereichert ist, können bestimmte DNA-Fragmente mit der ersteren Technik auch dann entdeckt werden, wenn sie über das Genom verteilt vorliegen.

Als Hinweis auf eine Y-spezifische repetitive Sequenz ist ein Ergebnis zu werten, das während der Restriktionsversuche mit *D. affinis*-DNA erzielt wurde. Eine im Fluoreszenzbild nach HaeIII-Verdauung erkennbare Bande von 1.75kb (Abb.14) war nur dann zu beobachten, wenn Y^L-♂♂-DNA verdaut wurde. Weder in Versuchen mit Y^S-♂♂ noch mit Y^O-♀♀ war sie zu erkennen. Es muß sich daher um eine repetitive DNA-Sequenz handeln, die auf das Y^L-Chromosom beschränkt ist.

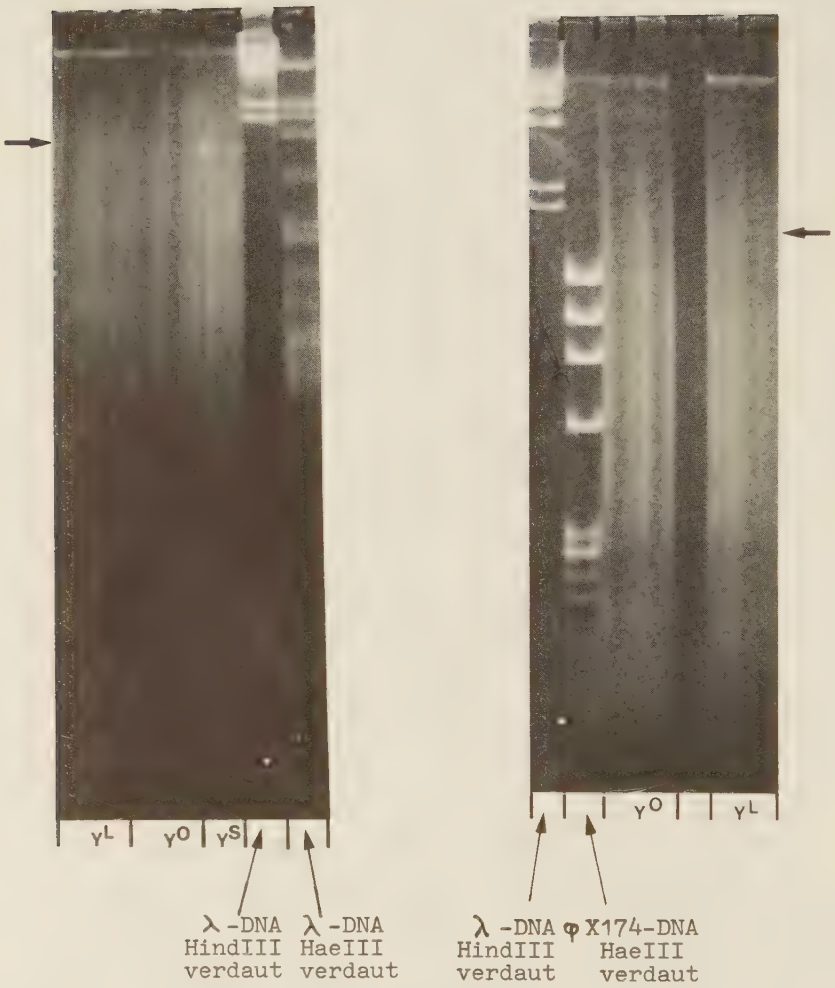


Abb.14: Ethidiumbromid-Fluoreszenz-Bilder der DNA-Fragmente nach Restriktion mit HaeIII und Auftrennung über Agarose-Gele (Agarose: SeaKem; Marine Colloids Inc.).
a) 2.4% Agarose-Gel; DNA von Y^L-♂♂, Y^O-♀♀ und Y^S-♂♂ (von links nach rechts)
b) 1.5% Agarose-Gel; DNA von Y^O-♀♀ (links) und Y^L-♂♂
Die Pfeile weisen auf die Y^L-spezifische Bande von 1.75kb.

5. rDNA-Analysen

5.1. Lokalisation der rRNA-Gene

Zur Lokalisation der rDNA (d.h. der NOs in den Chromosomen) wurden in situ-Hybridisierungen durchgeführt, zunächst mit rDNA aus dem Clon pDm103 von D. melanogaster (Glover und Hogness, 1977). Die rDNA hybridisierte mit dem X- und Y-Chromosom. Während die Markierung auf dem X-Chromosom jedoch gut reproduzierbar immer wieder an der gleichen Stelle gefunden wurde (auf dem zu einem Drittel heterochromatischen Arm etwa ein Drittel vom Kinetochor entfernt; Abb.15), war die Markierung auf dem Y-Chromosom nicht so deutlich lokalisierbar. Meistens war eine Markierung nahe dem Kinetochor auf dem langen Arm von Y^L festzustellen. Es waren aber häufig auch noch andere Stellen des Y-Chromosoms markiert, manchmal neben der eben beschriebenen starken Markierung auf dem langen Arm nahezu das ganze übrige Chromosom.

Da die pDm103-Sequenzen den 28S Insert enthalten und dieser bei D. melanogaster auch außerhalb der Nukleolenbildungsorte hybridisiert (Dawid und Botchan, 1977), wurde in weiteren Experimenten die D. melanogaster-DNA eines Insert-freien Clons verwendet (pDmre60). Während die in situ-Hybride nach Hybridisierung mit den Sequenzen dieses Clons weiterhin eine gute, reproduzierbare Lokalisation des X-NOs erlaubten, war die Markierung auf dem Y-Chromosom weiterhin nicht eindeutig. Neben einer deutlichen Markierung auf der kinetochornahen Hälfte des langen Arms des Y^L-Chromosoms gab es weiterhin auch andere Stellen auf dem Y, die eine positive Hybridisierungsreaktion zeigten (Abb.15).

Da Y^L sehr häufig Markierung auf dem langen Arm trägt und Y^S ebenfalls markiert ist, obwohl dem Y^S der distale Teil des langen Arms fehlt, scheint der Y-chromosomale NO am ehesten auf dem kinetochornahen Bereich des langen Arms lokalisiert zu sein.

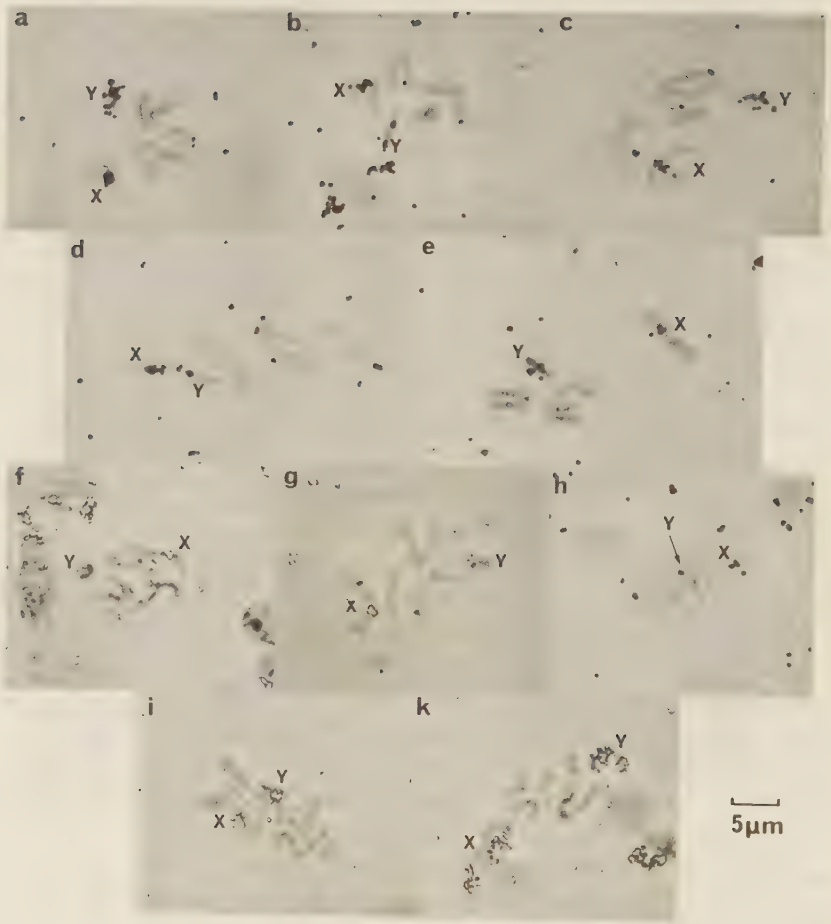


Abb.15: Autoradiographien von Mitosechromosomenpräparaten von D. affinis nach in situ-Hybridisierung mit clonierter rDNA.
a-e) Y^L-♂♂-Chromosomen; Hybridisierungsprobe: ^{3}H-pDm103
f-h) Y^S-♂♂-Chromosomen; Hybridisierungsprobe: ^{3}H-pDm103
i;k) Y^L-♂♂-Chromosomen; Hybridisierungsprobe: ^{3}H-pDmre60

5.2. Bestimmung der Cistronzahlen bei D. affinis

Die Zahl der rRNA-Gene wurde bei den verschiedenen Stämmen von D. affinis (Y^L,Y^S und Y^O) durch Filterhybridisierung bestimmt. Nach Ermittlung des rDNA-Gehalts von ♀♀ und ♂♂ eines Stammes ergibt sich die Möglichkeit, den Y-chromosomalen Anteil zu berechnen. Außerdem sollte überprüft werden, ob die Y^O-♂♂ Kompensationsphänomene zeigen (Tartof, 1973). Zur Ermittlung der Cistronzahlen wurde von dem photometrisch gemessenen (siehe 3. in II) DNA-Gehalt von 0.35pg/2C für die Y^L-♂♂ und von 0.30pg/2C für die Y^O-♂♂ ausgegangen. Die Genomgröße der ♀♀ wurde auf 0.37pg/2C festgesetzt, da das X-Chromosom in Metaphaseplatten etwa um die Hälfte länger ist als das Y^L-Chromosom. Für Y^S-♂♂ wurde ein Wert von 0.32pg/2C angenommen, da das Y^S-Chromosom etwa die Hälfte des Y^L-Chromosoms ausmacht.

Das Sättigungsniveau der Hybridisierung der D. affinis-DNA mit 28S rRNA wurde in Testversuchen ermittelt und begann bei einem Rot von 0.866 (Rot = Produkt aus RNA-Konzentration in Mol Nukleotiden pro Liter und der Hybridisierungsdauer in Sekunden). In zwei Hybridisierungsserien wurden 5 bis 8 Filter pro Genotyp unter Sättigungsbedingungen (Rot = 1.770) hybridisiert. Die Abb.16 zeigt eine recht starke Streuung der Hybridisierungswerte. Da eine solche Schwankung in den Daten zur Ermittlung der Sättigungsbereiche nicht vorlag, diese aber ohne DNA-Verlust-Bestimmung ermittelt wurden, könnte diese Streuung eine Folge der DNA-Bestimmungsmethode sein.

Im Y^L-Stamm zeigen ♂♂ und ♀♀ etwa gleiche Prozentsätze an rDNA (920 bzw. 960 Cistrons/2C). Die Hybridisierungswerte der Y^S-♂♂ ergaben 140 Cistrons weniger als die Y^S-♀♀ (870 bzw. 1010 Cistrons/2C). Beim Y^O-Stamm unterschieden sich ♂♂ und ♀♀ am stärksten. In den ♀♀ wurden 1420 Cistrons/2C gemessen, während die ♂♂ 570 Cistrons weniger aufwiesen. Mit 880 Cistrons/2C liegen sie 170 Cistrons über dem rDNA-Gehalt eines X-Chromosoms des Y^O-Stammes (710 Cistrons).

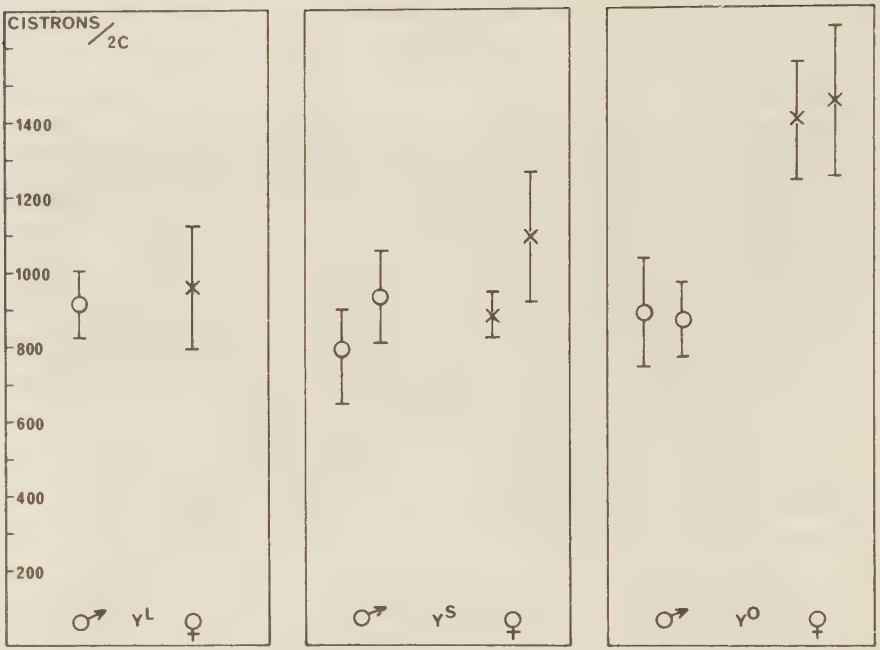


Abb.16: Filterhybridisierungssättigungswerte der verschiedenen Stämme von D. affinis und Vergleich zwischen ♂♂ und ♀♀ eines jeden Stammes.
Es wurde bei einem Rot von 1.770 hybridisiert. Der Background betrug 0.01 bzw. 0.005% der eingesetzten RNA-Menge (gemessen an Filtern, die mit 5µg Micrococcus-DNA beladen waren).

5.3. Restriktionsanalysen

5.3.1. DNA-Verdauung mit Eco RI

♂♂- und ♀♀-DNA eines Y^L-Stammes wurden mit Eco RI verdaut. Die Auswertung der Autoradiogramme ergab für beide Genotypen sowohl bei Hybridisierung mit 18S als auch mit 28S rRNA eine Radioaktivitätsbande bei einer Wanderungsweite im Gel, die einer Fragmentgröße von 11kb entspricht (1kb = 1000 Basenpaare DNA-Länge; Abb.17a).

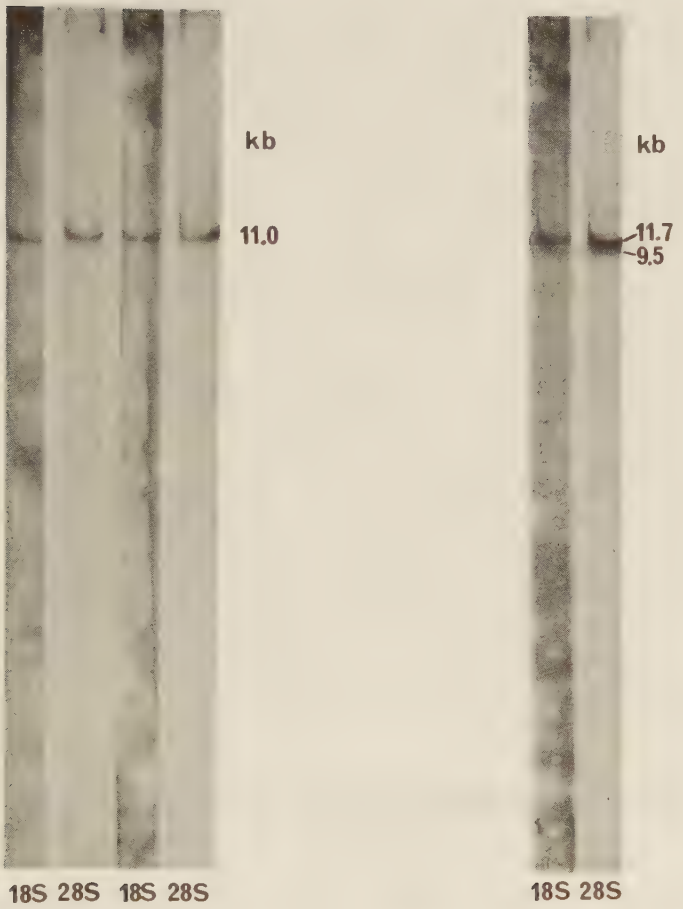


Abb.17: Hybridisierung mit ^{32}P- markierter 18S bzw. 28S rRNA über Eco RI-Restriktionsfragmente verschiedener D. affinis-Stämme nach Auftrennung über ein 0.7% Agarose-Flachgel und Southern-Transfer.
a) Y^L-♀♀-DNA (links) und Y^L-♂♂-DNA; b) Y^O-♀♀-DNA

Es kann demnach in der rDNA-Grundeinheit von D. affinis nur ein Eco RI-Schnitt vorliegen, und die Fragmentgröße von 11kb entspricht der Größe dieser Einheit. Im Rahmen der begrenzten Auflösung in einem so hohen Molekulargewichtsbereich im 0.7%-Gel ergaben sich weder Anzeichen

für eine Heterogenität der rDNA-Grundeinheit innerhalb eines Genotyps noch ein Hinweis auf einen Unterschied zwischen ♂♂ und ♀♀ (untersucht am Y^L-Stamm).

In einem Experiment, in dem die DNA von Y^O-♀♀ untersucht worden war, wurde allerdings nach Hybridisierung eine zweite rDNA-Bande geringerer Intensität von 9.5kb Länge beobachtet (Abb.17b). Dies wird im Zusammenhang mit Ergebnissen aus Restriktionsversuchen mit HaeIII (siehe 5.3.4.) als eine Variante der rDNA-Grundeinheit mit einem stark verkürzten nichttranskribierten Spacer (NTS) interpretiert.

Es wird im weiteren angenommen, daß der Eco RI-Schnitt an der gleichen Stelle kartiert, wie es für D. melanogaster nachgewiesen wurde - 0.27kb vom 3'-Ende entfernt in der 18S-Region (Glover und Hogness, 1977). Untersuchungen an D. hydei (Kunz, persönliche Mitteilung) wie auch an anderen Insekten - Calliphora (White, pers. Mitteilung) und Sciara (Renkawitz, pers. Mitteilung) - zeigen, daß die Lage dieses Eco-Schnittes stets gleich ist. Die im weiteren beschriebenen Ergebnisse sind mit dieser Annahme in Einklang zu bringen.

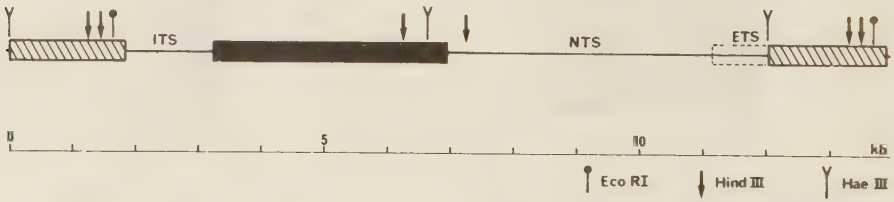


Abb.18: Restriktionskarte eines D. melanogaster-rDNA-Cistrons ohne Insertionssequenz in der 28S-Genregion
Die Längenangaben und die Lage der Schnittstellen von Eco RI, HindIII und HaeIII (soweit kartiert) wurden von Dawid und Botchan (1977), Wellauer et al. (1978) und von White und Hogness (1977) übernommen.

Die Größe des Eco RI-Fragments von 11kb entspricht dem bei D. melanogaster gefundenen Wert der rDNA-Grundeinheit ohne Insertionssequenz (Tartof und Dawid, 1976). Daraus und aus der Tatsache, daß keine Banden größeren Molekulargewichts gefunden wurden, wird geschlossen, daß D. affinis keine Insertionssequenzen in der 28S-Region aufweist.

5.3.2. Restriktionsanalyse mit Bam HI

Nach der Verdauung der DNA verschiedener Genotypen ($Y^L♂♂$, $Y^L♀♀$, $Y^O♀♀$ und $Y^L♂♂$ des Wildstammes) mit Bam HI entstand in allen Fällen ein identisches heterogenes Bild im Autoradiogramm (Abb.19). Von einer Bande hoher Intensität, die an der Wanderungsweite des Gels liegt, zieht sich eine diffuse Zone an Hybridisierung bis zu einer Stelle, die etwa 17kb langen Bruchstücken entspricht. Da dieser Wert nicht der durch Eco RI-Verdauung ermittelten Länge einer rDNA-Einheit entspricht und außerdem keine konkreten Banden ausgebildet werden, wird dieses Ergebnis so gedeutet, daß innerhalb der rDNA keine Bam HI-Schnittstelle existiert. Der heterogene Bereich wäre dadurch erklärbar, daß Bruchstücke, die durch das Ausgangsmolekulargewicht bestimmt sind, zum Teil etwas weiter in das Gel eingewandert sind.

Die Möglichkeit, daß das Enzym nicht in genügender Menge eingesetzt wurde, erscheint ausgeschlossen. Mit anderen Restriktionsenzymen ergab nämlich eine nicht vollständig verdaute Probe stets eine Reihe distinkter Banden höherer Molekulargewichte, was bei Bam HI nicht gegeben war.

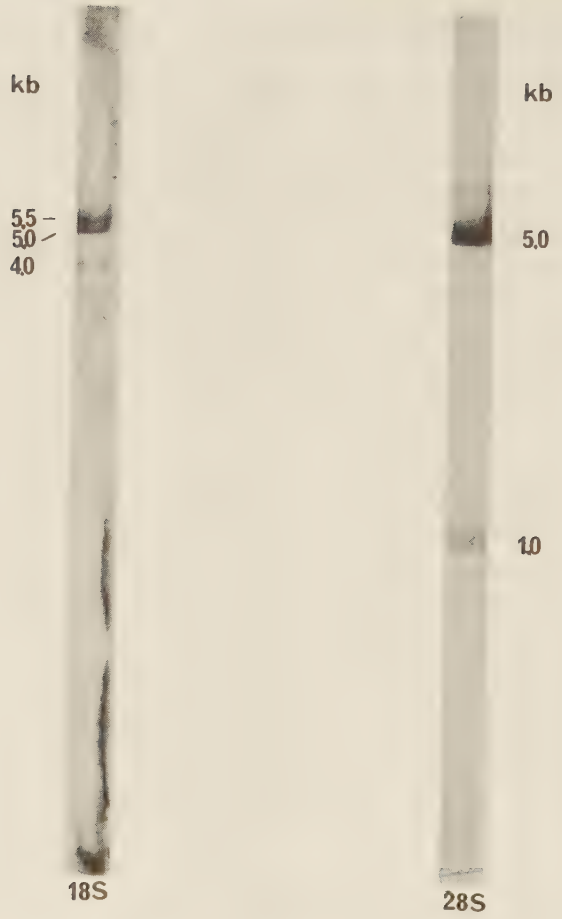
Die Tatsache, daß bei D. affinis mit Bam HI keine Verdauung der rDNA zu erzielen war, kann als weiterer Hinweis darauf gewertet werden, daß es in D. affinis keine 28S-Insertion gibt. Innerhalb der Insertionssequenz liegen nämlich bei D. melanogaster die einzigen bekannten Bam HI-Schnitte.

Abb.19: Autoradiographisches Bild der Y^L-$\delta\delta$-DNA nach Restriktion mit Bam HI und Hybridisierung mit ^{32}P-markierter 18S bzw. 28S rRNA.
Es wird geschlossen, daß in der rDNA keine Bam HI-Erkennungssequenz existiert.

5.3.3. rDNA-Fragmente nach Restriktion mit HindIII

Da in den Eco RI-Experimenten kein Unterschied zwischen ♂♂ und ♀♀ festgestellt wurde, wurde in den folgenden Versuchen meist nur Y^L♂♂-DNA verwendet. Nach Verdauung mit HindIII hybridisierten vier Fragmente verschiedener Länge mit rRNA (Abb.20), ein 1.0kb-Stück reagiert mit 28S rRNA, zwei Fragmente - 5.5 und 4.0kb - hybridisieren nur mit 18S rRNA. Ein 5.0kb-HindIII-Fragment zeigt homologe Sequenzen zu 18S und 28S rRNA. In Restriktions-Experimenten mit HindIII und Eco RI zusammen wurde gefunden, daß das 5.0kb-HindIII-Fragment durch Eco RI um 0.5kb gekürzt wird. Aus der in 5.3.1. begründeten Homologisierung des Eco RI-Schnittes von D. affinis mit dem von D. melanogaster folgt, daß das 5.0kb-HindIII-Fragment etwa 0.7kb vor dem 18S-3'-Ende beginnt, den ganzen internen transkribierten Spacer (ITS) umfaßt und noch etwa 3kb in die 28S-Region ragt. Dabei wird der ITS in Homologie zu D. melanogaster ebenfalls mit 1.4kb Länge angenommen. Am 3'-Ende der 28S rRNA liegt das 1.0kb-Fragment. Die beiden restlichen Fragmente - 5.5 und 4.0kb - unterscheiden sich in ihrer Größe, während ihr Hybridisierungsverhalten (positiv mit 18S rRNA; negativ mit 28S rRNA) gleich ist. Die Fragmente beinhalten bis auf 0.3kb den ganzen NTS, den externen transkribierten Spacer (ETS) und einen großen Teil der 18S rRNA-Region (vom 5'-Ende her). Das bedeutet, daß der NTS eine Längenheterogenität aufweisen muß, die etwa 1.5kb umfaßt und die in den Eco RI-Gelen nicht aufgelöst wurde.

Die Lage der Restriktionsstellen von HindIII ist im Rahmen der Meßgenauigkeit den bei D. melanogaster beschriebenen homolog. Glover und Hogness (1977) fanden eine Schnittstelle von HindIII etwa 0.27kb vom Eco RI-Schnitt zum 5'-Ende der 18S rRNA-Region hin verschoben. Innerhalb der 28S rRNA liegt ein Schnitt 0.7kb vor dem 3'-Ende; 0.3kb im NTS schneidet HindIII ebenfalls (vgl. Abb.18). Nach diesen Daten würde bei D. affinis ein kleines HindIII-Fragment innerhalb der 18S-Region (0.25kb) fehlen. Ein solches Fragment kann jedoch in den hier ver-



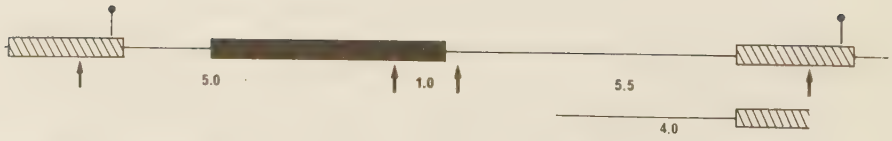


Abb.20: Y^L-♂♂-DNA wurde mit HindIII verdaut, über ein 1% Agarose-Gel aufgetrennt, nach der Methode von Southern transferiert und mit 18S bzw. 28S rRNA hybridisiert. Aus den Fragmenten resultiert eine Länge der rDNA-Grundeinheit von 11.5 bzw. 10.0kb (NTS + ETS 4.6 bzw. 3.1kb lang).

wendeten Gelen aufgrund seiner Kleinheit nicht entdeckt werden. Es könnte jedoch auch sein, daß der zweite HindIII-Schnitt in der 18S-Region von D. melanogaster bei D. affinis nicht existiert, wofür die hier bestimmte Distanz von 0.5kb des D. affinis-18S-HindIII-Schnitts zum Eco RI-Schnitt spricht.

Abb. 20 faßt die Ergebnisse der Restriktion mit HindIII zusammen.

5.3.4. Verdauung von D. affinis-DNA mit HaeIII

Das Enzym HaeIII benötigt nur eine 4^{er}-Sequenz als Erkennungsstelle; es schneidet DNA also mit einer höheren Wahrscheinlichkeit als die bisher verwendeten Enzyme, die alle eine 6^{er}-Erkennungsregion haben. Dementsprechend liefert eine Verdauung mit HaeIII deutlich mehr rDNA-Restriktionsfragmente. Gele, die mit 18S rRNA hybridisiert wurden, zeigen drei Fragmente, die 0.6, 0.7 und 2.2kb lang sind. Mit 28S rRNA hybridisierten vier deutlich sichtbare Fragmente der Größen 0.4, 0.6, 0.7 und 1.0kb, sowie mehrere Banden im Bereich von 3.2 bis 5.7kb.

Nur die zwei größten Fragmente konnten innerhalb der rDNA-Einheit eindeutig lokalisiert werden (Abb.22). Das 2.2 (2.1)kb-HaeIII-Stück wird in Eco RI-HaeIII-Doppel-Verdauungsexperimenten sowohl bei Hybridisierung mit 18S als auch mit 28S rRNA um ca. 0.4kb gekürzt; die 2.2kb-Fragmente im 18S- bzw. 28S rRNA-Hybridisierungsbild sind demnach identisch. Das Doppel-Verdauungs-Experiment zeigt außerdem, daß ein HaeIII-Schnitt 0.4kb von der Eco RI-Stelle zum 5'-Ende der 18S rRNA hin liegen muß. Das 2.2kb-HaeIII-Fragment enthält also etwa 0.6kb der 18S-Region, den gesamten ITS und noch ca. 0.2kb der 28S-Region.

Im Molekulargewichtsbereich des größten HaeIII-Fragments, das einen Teil des 28S-Bereichs enthält, findet sich je nach untersuchtem Genotyp eine unterschiedliche Anzahl von Banden.

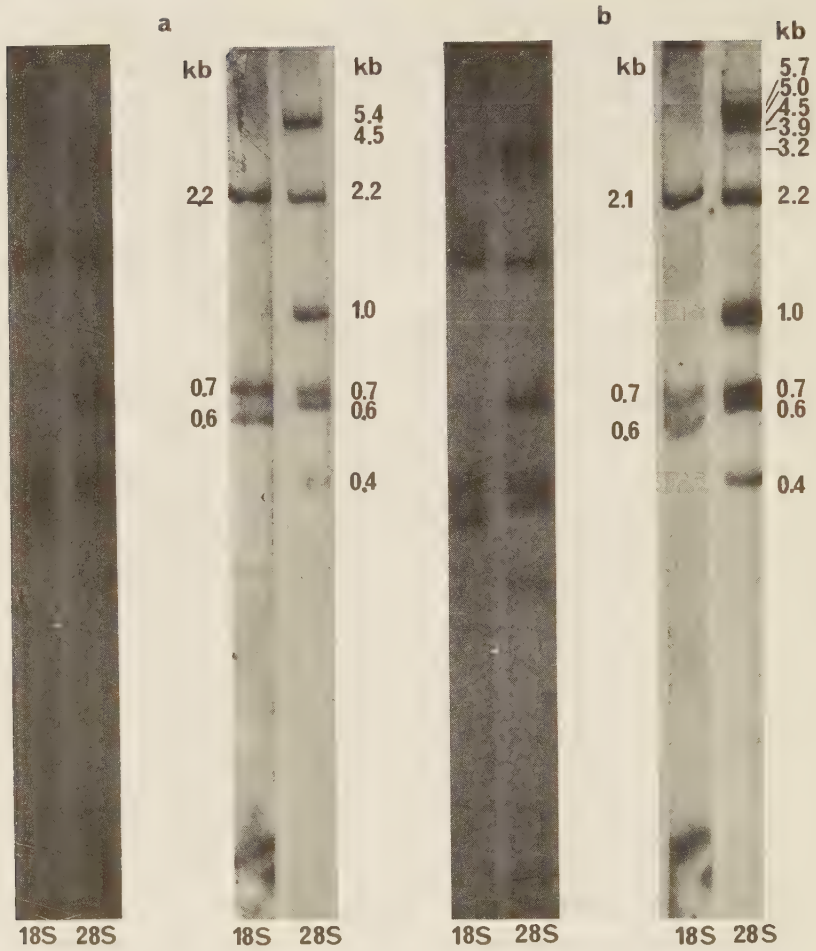


Abb.21: Autoradiographien von D. affinis-DNA nach Restriktion mit HaeIII und Hybridisierung mit rRNA
a) Y^L-♂♂-DNA aufgetrennt in 1.5% (links) bzw. 2% (rechts) Agarose-Gelen
b) Y^O-♀♀-DNA aufgetrennt in 1.5% (links) bzw. 2% (rechts) Agarose-Gelen

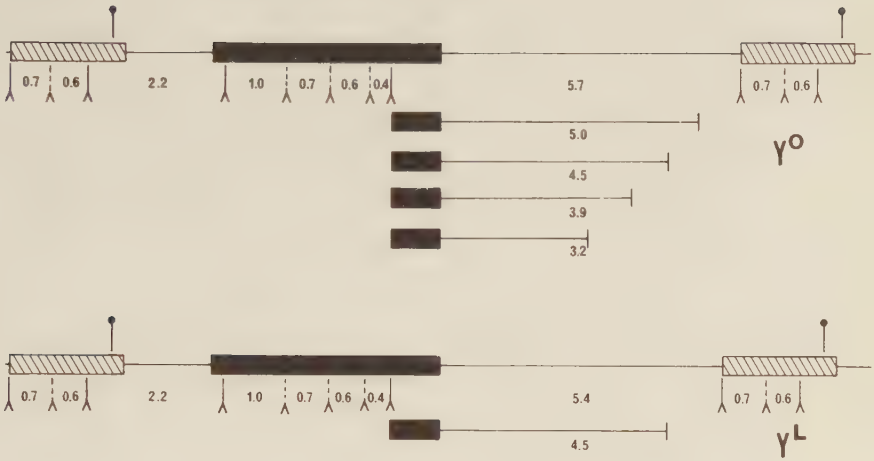


Abb.22: HaeIII-Restriktionskarte der zwei untersuchten D. affinis-Populationen (Y^O und Y^L)
Die aus den Fragmenten errechnete Länge der rDNA-Einheit beträgt 11.9 bis 9.4kb im Falle der Y^O-♀♀ und 11.6 bzw. 10.7kb im Falle der Y^L-♂♂.

Im Falle der Y^L-♂♂ wurden zwei Banden - 5.4 und 4.5kb - beobachtet (siehe Abb.21a). Wurden die rDNA-Fragmente von Y^O-♀♀ hybridisiert, so wurden bis zu fünf Banden in diesem Bereich aufgelöst (Abb.21b). Da diese Fragmente wegen ihrer Größe außer dem 28S-Stück nur den Bereich des NTS und ETS umfassen können (vgl. Abb.22), werden sie alle mit einer Heterogenität der rDNA-Cistrons im NTS erklärt. Solche Längenunterschiede im NTS sind bei D. melanogaster beschrieben und treten in gleicher Weise in der rDNA des X- wie des Y-Chromosoms auf (Wellauer et al., 1978). Nach diesen Ergebnissen zeigt der

Y^O-Stamm eine viel größere Heterogenität im NTS, sowohl in der Längendifferenz zwischen den verschiedenen NTS-Typen als auch in der Anzahl der unterschiedlichen NTS-Typen (siehe auch die Versuche mit Eco RI in 5.3.1.).

Der NTS + ETS ist bei den $\underline{Y^O\text{-}♀♀}$ 4.9, 4.2, 3.7, 3.1 und 2.4kb lang.

Die $\underline{Y^L\text{-}♂♂}$ zeigen NTS + ETS-Längen von 4.6 und 3.7kb.

Diese Daten wurden in einer Restriktionskarte dargestellt (Abb.22).

IV Diskussion

Konstitutives Heterochromatin kommt in nahezu allen Tier- und Pflanzenarten vor. Es ist dadurch gekennzeichnet, daß es in der Regel teilweise oder ganz fehlen kann, ohne daß die Organismen dadurch deutlich beeinträchtigt werden. Während der Polytänisierung zum Beispiel werden heterochromatische Chromosomenabschnitte unterrepliziert, so daß Polytängewebe weit weniger Heterochromatinanteile enthalten (Gall et al., 1971; Dickson et al., 1971). Bei D. hydei ist es möglich,ein attached-X-Chromosom zu erzeugen, wobei das meiste X-chromosomale Heterochromatin eliminiert wird (Hess, 1976). Auch diese Tiere sind in ihrer Vitalität nicht oder kaum beeinträchtigt. Vergleicht man nahe verwandte Arten miteinander, so wird deutlich, daß der Heterochromatinanteil stark variieren kann, ohne daß deutliche Vorteile für die eine oder andere Art erkennbar sind (z.B. Wasserman, 1962). Im konstitutiven Heterochromatin ist die hochrepetitive DNA (Satelliten-DNA im engeren Sinne) lokalisiert.

Andersartig scheint bei vielen Tierarten das Y-chromosomale Heterochromatin zu sein, weil es DNA-Sequenzen mit genetischer Funktion enthält. Speziell bei Drosophila enthält das Y-chromosomale Heterochromatin einen Nukleolenbildungsort (z.B. Ritossa und Spiegelman, 1965) und Gene, die für die Fertilität der Männchen essentiell sind (Hess und Meyer, 1968). Es unterscheidet sich auch von 'normalem' konstitutivem Heterochromatin dadurch, daß in ihm kaum hochrepetitive Sequenzen nachgewiesen werden konnten (Gall et al., 1971; Hennig, 1972)

Es wurde untersucht, ob diese drei Eigenschaften - NO, Fertilitätsfaktoren, keine Satelliten - auch für das Y-Chromosom von D. affinis zutreffen, ein Y-Chromosom, dessen Fehlen nur zu Vitalitätsminderung (Voelker und Kojima 1971) nicht aber zu Sterilität führt. Außer den natürlich vorkommenden X/O-Tieren (Y^O) können auch X/O-Tiere aus den Y^L- und Y^S-Stämmen mittels Nondisjunction erzeugt werden. Diese sind dann in vollkommener Übereinstimmung

mit der Erwartung, die man aufgrund der Heteromorphie des Y-Chromosoms bei D. affinis haben kann, nicht steril, wie bei anderen Arten, sondern fertil. Wegen dieser Eigenschaften war die Vorstellung nicht unberechtigt, daß das Y-Chromosom von D. affinis sich anders verhält als bei anderen Drosophila-Arten, d.h., da es in somatischen Zellen heterochromatisch ist, daß es sich mehr wie normalerweise konstitutives Heterochromatin verhält.

Das Profil der Schmelzkurven (III 2.2) gibt keinerlei Hinweise auf hochrepetitive DNA-Sequenzen. Desgleichen konnten in neutralen CsCl-Gradienten (III 2.1.) keine Satellitenfraktionen abgetrennt werden.

Auch mit Komplexierungsexperimenten, in denen nicht nur Satellitensequenzen, sondern auch mittelrepetitive DNA-Fraktionen (Zusammenfassung: Brown und Stern, 1974) abgetrennt werden können, war es nicht möglich, Y-spezifische Sequenzen zu finden.

Der einzige Hinweis auf eine repetitive Sequenz auf dem Y-Chromosom von D. affinis kommt aus den Restriktionsexperimenten mit HaeIII. Die im Fluoreszenzbild erkennbare Bande (1.75kb) kann nur zustande kommen, wenn es sich um Sequenzen repetitiver Natur handelt. Da die Bande in Y^L-Männchen, jedoch nicht in Weibchen und Y^S-Männchen auffindbar war, kann man schließen, daß sie auf dem Teil des Y-Chromosoms liegen muß, der den Y^S-Männchen fehlt.

An DNA aus menschlichem Gewebe beschrieben Cooke (1976) und Bostock et al. (1978) vergleichbare Ergebnisse. Sie fanden nach HaeIII-Verdauung eine 3.5 und eine 2.4kb-Bande, die nur bei Verwendung von DNA aus männlichem Gewebe auftrat. Die 3.5kb-Bande wurde genauer untersucht, und man stellte fest, daß die Sequenz der des Satelliten III sehr ähnlich ist und daß sie einem bestimmten Y-Chromosomenabschnitt zugeordnet werden kann (Bostock et al., 1978).

Untersuchungen an anderen Arten der Unterordnung Sophophora (Hess, 1967), wozu D. affinis gehört, legen nahe, daß das in den primären Spermatozytenkernen von D. affinis beobachtete gränuläre Material den bei D. hydei

gut untersuchten Lampenbürstenschleifen entspricht. Bei D. melanogaster wurde von einem ähnlich undifferenzierten Material wie bei D. affinis nachgewiesen, daß es vom Y-Chromosom gebildet wird (Meyer et al., 1961).

Da Männchen des Y^O-Stammes ebenso wie künstlich erzeugte X/O-Tiere der anderen Populationen (Y^L und Y^S) bei D. affinis fertil sind, müssen die Y-Fertilitätsfaktoren autosomal oder X-chromosomal lokalisiert sein. Ein zytologischer Vergleich - unter Anwendung verschiedener Heterochromatin-Färbemethoden - mit den nahe verwandten Arten D. athabasca und D. tolteca, deren Männchen das Y-Chromosom zur Fertilität benötigen, ergab keine Hinweise auf eine eventuelle Y-Heterochromatin-Translokation bei D. affinis (eigene Untersuchungen).

Der Schluß, daß bei D. affinis die Fertilitätsfaktoren autosomal oder X-chromosomal lokalisiert sind, spricht nicht zwingend gegen die Lokalisation weiterer Fertilitätsfaktoren auf dem Y-Chromosom. Hess und Meyer (1963) wiesen für D. hydei und D. melanogaster nach, daß bei diesen Arten Männchen mit zwei Y-Chromosomen doppelt so lange Spermien haben wie die Wild-Männchen. Meine Messungen zeigen jedoch, daß bei D. affinis Genotypen mit und ohne Y-Chromosom gleich lange Spermien haben. Außerdem haben X/Y/Y-Tiere bei D. hydei eine deutlich verlangsamte Spermatogenese und sind weniger fertil als X/Y-Tiere (Hess und Meyer, 1963), was bei Y^L- und Y^S-Typen von D. affinis gegenüber den Y^O-Typen nicht beobachtet wurde. Diese beiden Daten sprechen gegen das Vorhandensein funktionstüchtiger Fertilitätsfaktoren auf dem Y-Chromosom.

Bisher wurden bei vielen Drosophila-Arten Nukleolenbildungsorte (NO) auf beiden Geschlechtschromosomen festgestellt. Innerhalb der Unterordnung Sophophora haben sowohl D. melanogaster als auch D. simulans je einen NO im Heterochromatin des X- und Y-Chromosoms (Cooper, 1959; Schäfer und Schäfer, 1978). Die hier beschriebenen Experimente sprechen für eine gleiche Situation bei D. affinis.

X/O-Tiere bei D. melanogaster haben eine erheblich größere Cistronzahl als dem Niveau eines einzelnen X-NOs

(gemessen an Wild-Weibchen) entspricht (Tartof, 1971). Während das X-Chromosom in X/X-Weibchen und X/Y-Männchen bei D. melanogaster nur 250 rRNA-Cistrons hat, wurden an X/O-Tieren 400 Cistrons gemessen. Dieses Phänomen wurde von Tartof Genkompensation genannt.

Auch die Männchen des Y^O-Stammes haben einen rDNA-Gehalt, der signifikant über dem Wert eines X-Chromosoms des Y^O-Stammes liegt (170 rRNA-Cistrons mehr als ein X-NO im Weibchen). Das Besondere hierbei ist, daß es sich bei D. affinis um eine Genkompensation handelt, die ständig und in der ganzen Population beibehalten wird, also eine genetisch natürliche Situation, in der kompensiert wird. Demgegenüber sind die X/O-Männchen von D. melanogaster Tiere, die ein experimentell verändertes Genom haben und darauf mit Kompensation reagieren.

Der rDNA-Gehalt der Weibchen des Y^O-Stammes ist gegenüber den Weibchen der anderen Stämme (Y^L und Y^S) stark erhöht. Diese Differenz wird als Populationsunterschied interpretiert. Daß sich verschiedene Populationen einer Art in ihrem rDNA-Gehalt um mehr als das Doppelte unterscheiden können, ist bei einer Reihe von Tier- und Pflanzenarten beobachtet worden (Zusammenfassung: Maggini et al., 1978). Andererseits ist aber auch denkbar, daß in Populationen ohne Y-Chromosom der X-chromosomale rDNA-Gehalt sich stets auf einem höheren Niveau befindet als in Populationen mit einem Y-Chromosom.

Die heterogene Reaktion auf dem Y-Chromosom im Vergleich zur X-NO-Lokalisation bei den in situ-Hybridisierungen führte zu der Vermutung, daß die Organisation der rDNA der beiden NOs nicht identisch sein könnte. Restriktionsuntersuchungen bieten eine Möglichkeit, eventuell vorhandene Unterschiede zwischen den rDNA-Grundeinheiten schon an Gesamt-DNA zu finden, sofern es sich nicht um sehr geringfügige oder in wenigen Cistrons vorhandene Veränderungen handelt. Aus den hier unternommenen Experimenten ist deutlich zu erkennen, daß die erstellten Restriktionskarten nach Verdauung mit Eco RI, HindIII und HaeIII mit den bei D. melanogaster ermittelten Daten homologisiert werden können (vgl. III 5.3.).

Im Gegensatz zu D. melanogaster wurde allerdings nie ein Hinweis auf das Vorhandensein einer Insertionssequenz erhalten (siehe III 5.3.1. und 5.3.2.). Dies ist bemerkenswert, da in den drei untersuchten Drosophila-Arten (D. melanogaster, D. hydei und D. virilis) solche Sequenzen nachgewiesen werden konnten. Bei D. melanogaster gibt es zwei verschiedene Insertionssequenzen (TypI und TypII). TypI ist wahrscheinlich nur X-chromosomal lokalisiert, während TypII in beiden NOs in gleicher Häufigkeit vorkommt (Wellauer et al., 1978). Bei D. hydei wurde eine Insertionssequenz nachgewiesen, die ausschließlich X-chromosomal vorhanden ist (Kunz et al., unveröffentlicht). D. virilis hat ebenfalls eine Insertionssequenz, die hier aber in gleicher Weise im X- und Y-chromosomalen NO vertreten ist (Barnett und Rae, 1977). Bei anderen Insektenarten sind sowohl Fälle mit einer 28S-Insertion (Calliphora erythrocephala; White, pers. Mitteilung) als auch solche ohne 28S-Insertion (Sciara coprophila; Renkawitz, pers. Mitteilung) beschrieben worden.

Während mit den verwendeten Restriktionsenzymen in keinem Fall ein Unterschied zwischen X- und Y-chromosomaler rDNA festgestellt werden konnte, ergaben sich Differenzen im Cistronaufbau beim Vergleich verschiedener D. affinis-Populationen. Große Längenunterschiede des NTS innerhalb von Populationen als natürlich vorkommende Variabilitäten sind in mehreren Untersuchungen ermittelt worden. Wellauer et al. (1976) fanden bei Xenopus laevis NTS-Regionen, die sich bis zu 5.7kb in ihrer Länge unterschieden (2.8 bis 8.5kb). Bei D. melanogaster wurden NTS-Längenvariationen von etwa 3kb beschrieben (Wellauer und Dawid, 1977). Eine derartige Variabilität im NTS wurde auch für D. affinis nachgewiesen. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß bestimmte NTS-Längen auf eine Population beschränkt sind, eine Beobachtung, die bisher noch bei keiner Art gemacht wurde.

Die in der Einleitung ausgesprochene Vermutung,

daß das Y-Chromosom von D. affinis molekular anders-artig als in vielen Drosophila-Arten gestaltet sein könnte, weil es sich genetisch anders verhält, hat sich durch die hier beschriebenen Versuche nicht bestätigt. Obwohl es frei von Fertilitätsfaktoren ist, teilt es mit den Y-Chromosomen anderer Drosophila-Arten die Eigenschaften, daß es keine hochrepetitiven DNA-Sequenzen, wohl aber rRNA-Gene enthält.

V Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die molekulare Zusammensetzung des konstitutiven Heterochromatins, speziell des Y-chromosomalen Heterochromatins, bei D. affinis, einer Art mit Y-Polymorphismus, charakterisiert.

Aus Schmelzanalysen, Gradientenzentrifugationen und Komplexierungsuntersuchungen mit Silber, Quecksilber und Netropsinsulfat wird gefolgert, daß das Y-Heterochromatin, aber auch das andere konstitutive Heterochromatin , bei D. affinis keine oder nur geringe Mengen an Satellitensequenzen enthalten. Durch zwei hintereinandergeschaltete verschiedene Komplexierungsschritte wurden zwanzig Fraktionen aus dem D. affinis-Genom isoliert und jodiniert. Keine dieser ^{125}J-DNA-Fraktionen konnte auf Mitose- und Polytänchromosomen lokalisiert werden, was den Schluß zuläßt, daß sie alle nur Sequenzen geringen Repetitivitätsgrades enthalten oder daß die Sequenzen im Genom verstreut sind. Jedoch deutet das Auffinden einer Y^L-spezifischen Bande nach HaeIII Verdauung darauf hin, daß zumindest eine repetitive Sequenz auf dem langen Arm des Y^L-Chromosoms lokalisiert ist.

Die Lage von Y-Fertilitätsfaktoren wurde mit Hilfe zytologischer Methoden untersucht; diese Versuche legen nahe, daß das Y-chromosomale Heterochromatin bei D. affinis nicht Träger von funktionstüchtigen Fertilitätsfaktoren ist. Die normalerweise auf dem Y gefundenen Fertilitätsfaktoren müssen hier autosomal oder X-chromosomal lokalisiert sein.

In situ-Hybridisierungsexperimente zeigten, daß D. affinis auf beiden Typen von Y-Chromosomen (Y^L und Y^S), wie auch auf dem X-Chromosom, je einen Nukleolenbildungsort (NO) trägt. Dennoch ist der rDNA-Gehalt der Y^O-Männchen etwa gleich groß wie in den Männchen der anderen Populationen, wie durch Filtersättigungshybridisierungen ermittelt wurde. Dies wird als eine der Genkompensation vergleichbare Aufregulierung interpretiert.

Der Feinaufbau der rRNA-Gene wurde durch Restriktionsanalysen von Gesamt-DNA untersucht. Ein Unterschied zwischen X- und Y-chromosomaler rDNA, wie er für die nahe verwandte Art D. melanogaster bekannt ist, wurde nicht gefunden. Dage-

gen wurde erstmalig für eine Art ein Populationsunterschied in den Längenvariationen des nichttranskribierten Spacers (NTS) beschrieben. Die Y^O-Population weist deutlich mehr Klassen an NTS-Längen auf, die auch einen größeren Längenbereich umfassen, als die Y^L-Population. Im Gegensatz zu allen bisher untersuchten Drosophila-Arten hat D. affinis keine Insertionssequenzen im 28S-Genbereich. Gemeinsam mit D. melanogaster sind jedoch die Positionen der ermittelten Schnittstellen von den Restriktionsenzymen Eco RI, HindIII und HaeIII.

VI Literaturverzeichnis

ALTENBURG, L.C., M.J. GETZ und G.F. SAUNDERS (1975) ^{125}J in molecular hybridization experiments. Meth. Cell Biol. 10, 325-342

BARNETT, T., und P.M.M. RAE (1977) Sequence arrangement in the ribosomal DNA of Drosophila virilis. J. Cell Biol. 75, 131a

BONNER, J.J., und M.L. PARDUE (1976) Ecdysone-stimulated RNA synthesis in imaginal discs of Drosophila melanogaster. Chromosoma (Berl.) 58, 87-99

BOSTOCK, C.J., J.R. GOSDEN und A.R. MITCHELL (1978) Localisation of a male-specific DNA fragment to a sub-region of the human Y chromosome. Nature 272, 324-328

BROWN, D.D., und R. STERN (1974) Methods of gene isolation. Ann. Rev. Biochem. 43, 667-693

BRUTLAG, D., R. APPELS, E.S. DENNIS und W.J. PEACOCK (1977) Highly repeated DNA in Drosophila melanogaster. J. Mol. Biol. 112, 31-47

BULTMANN, H., R.A. ZAKOUR und M.A. SOSLAND (1976) Evolution of Drosophila mitochondrial DNAs. Comparison of denaturation maps. Biochim. Biophys. Acta 454, 21-44

COMMERFORD, S.L. (1971) Iodination of nucleic acids in vitro. Biochemistry 10, 1993-1999

COOKE, H. (1976) Repeated sequence specific to human males. Nature 262, 182-186

COOPER,K.W. (1959) Cytogenetic analysis of major heterochromatic elements (especially Xh and Y) in Drosophila melanogaster, and the theory of "heterochromatin". Chromosoma (Berl.) 10, 535-588

CORNEO, G., E. GINELLI und E. POLLI (1970) Different satellite deoxyribonucleic acids of guinea pig and ox. Biochemistry 9, 1565-1571

DAWID, I.B. (1977) DNA-DNA hybridization on membrane filters: a convenient method using formamide. Biochim. Biophys. Acta 477, 191-194

DAWID, I.B., und P. BOTCHAN (1977) Sequences homologous to ribosomal insertions occur in the Drosophila genome outside the nucleolus organizer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4233-4237

DICKSON, E., J.B. BOYD und C.D. LAIRD (1971) Sequence diversity of polytene chromosome DNA from Drosophila hydei. J. Mol. Biol. 61, 615-627

GALL, J.G., E.H. COHEN und M.L. POLAN (1971) Repetitive DNA sequences in Drosophila. Chromosoma (Berl.) 33, 319-344

GLOVER, D.M., und D.S. HOGNESS (1977) A novel arrangement of the 18S and 28S sequences in a repeating unit of Drosophila melanogaster rDNA. Cell 10, 167-176

GRACE, T.D.C. (1962) Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. Nature 195, 788-789

HAYWARD, G.S., und M.G. SMITH (1972) The chromosome of bacteriophage T5. I. Analysis of the single-stranded DNA fragments by agarose gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 63, 383-395

HENNEN, S., S. MIZUNO und H.C. MACGREGOR (1975) In situ hybridization of ribosomal DNA labelled with ^{125}Iodine to metaphase and lampbrush chromosomes from newts. Chromosoma (Berl.) 50, 349-369

HENNIG, W. (1972) Highly repetitive DNA sequences in the genome of Drosophila hydei. I. Preferential localization in the X chromosomal heterochromatin. J. Mol. Biol. 71, 407-417

HENNIG, W., W. KUNZ, B. SCHNIEDERS und K. WILLIAMS (1971) Vergleichende Analyse der nach den Extraktionsmethoden von Kirby und Georgiev aus Mäuseleber extrahierten RNS-Fraktionen. Z. Naturforsch. 26b, 235-243

HESS, O. (1967) Morphologische Variabilität der chromosomalen Funktionsstrukturen in den Spermatocytenkernen von Drosophila-Arten. Chromosoma (Berl.) 21, 429-445

HESS, O. (1976) Genetics of Drosophila hydei Sturtevant. In: E. Novitsky und M. Ashburner (Hrsg.) "The Genetics and Biology of Drosophila" 1c, 1343-1363

HESS, O., und G.F. MEYER (1963) Chromosomal differentiations of the lampbrush type formed by the Y chromosome in Drosophila hydei and Drosophila neohydei. J. Cell Biol. 16, 527-539

HESS, O., und G.F. MEYER (1968) Genetic activities of the Y chromosome in Drosophila during spermatogenesis. Adv. Genet. 14, 171-223

HOLMQUIST, G. (1975) Hoechst 33258 fluorescence staining of Drosophila chromosomes. Chromosoma (Berl.) 49, 333-356

MACGREGOR, H.C., und S. MIZUNO (1976) In situ hybridization of "nick-translated" ^{3}H-ribosomal DNA to chromosomes from salamanders. Chromosoma (Berl.) 54, 15-25

MAGGINI, F., P. BARSANTI und T. MARAZIA (1978) Individual variation of the nucleolus organizer regions in Allium cepa and A. sativum. Chromosoma (Berl.) 66, 173-183

MATTHEWS, H.R., E.M. JOHNSON, W.M. STEER, E.M. BRADBURY und V.G. ALLFREY (1978) The use of netropsin with CsCl gradients for the analysis of DNA and its application to restriction nuclease fragments of ribosomal DNA from Physarum polycephalum. Eur. J. Biochem. 82, 569-576

MAXAM, A.M., und W. GILBERT (1977) A new method for sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560-564

MEYER, G.F., O. HESS und W. BEERMANN (1961) Phasenspezifische Funktionsstrukturen in Spermatocytenkernen von Drosophila melanogaster und ihre Abhängigkeit vom Y-Chromosom. Chromosoma (Berl.) 12, 676-716

MILLER, D.D., und L.E. STONE (1962) Reinvestigation of karyotype in Drosophila affinis Sturtevant and related species. J. Hered. 53, 12-24

PARDUE, M.L., und J.G. GALL (1975) Nucleic acid hybridization to the DNA of cytological preparations. Meth. Cell Biol. 10, 1-16

PRENSKY, W. (1976) The radioiodination of RNA and DNA to high specific activities. Meth. Cell Biol. 13, 121-152

RASCH, E.M., H.J. BARR und R.W. RASCH (1971) The DNA content of sperm of Drosophila melanogaster. Chromosoma (Berl.) 33, 1-18

RENKAWITZ, R. (1977) Isolierung, Charakterisierung und Lokalisation bestimmter heterochromatischer DNA-Fraktionen von Drosophila hydei. Dissertation, Math.-Nat. Fakultät, Universität Düsseldorf

RENKAWITZ, R. (1978) Two highly repetitive DNA satellites of Drosophila hydei localized within the α-heterochromatin of specific chromosomes. Chromosoma (Berl.) 66, 237-248

RINEHART, F.P., V.L. WILSON und C.W. SCHMID (1977) Fractionation of the sequence organization of human DNA by preparative $HgCl_2/Cs_2SO_4$ density gradients. Biochim. Biophys. Acta 474, 69-81

RITOSSA, F.M., und S. SPIEGELMAN (1965) Localization of DNA complementary to ribosomal RNA in the nucleolus organizer region of Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53, 737-745

SCHÄFER, U., und M. SCHÄFER (1978) Localization of rRNA genes in Drosophila simulans. (Abstract) Cytobiologie im Druck

SCHILDKRAUT, C.L., J. MARMUR und P. DOTY (1962) Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from buoyant density in CsCl. J. Mol. Biol. 4, 430-443

SCHNEIDER, I. (1972) Cell lines derived from late embryonic stages of Drosophila melanogaster. J. Embryol. exp. Morph. 27, 353-365

SHARP, P.A., B. SUGDEN und J. SAMBROOK (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. Biochemistry 12, 3055-3063

SHEN, C.J., G. WIESEHAHN und J.E. HEARST (1976) Cleavage patterns of Drosophila melanogaster satellite DNA by restriction enzymes. Nucl. Acids Res. 3, 931-952

SOUTHERN, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517

SUGDEN, B., B. DE TROY, R.J. ROBERTS und J. SAMBROOK (1975) Agarose slab-gel electrophoresis equipment. Anal. Biochem. 68, 36-46

SWANSTROM, R., und P.R. SHANK (1978) X-ray intensifying screens greatly enhance the detection by autoradiography of the radioactive isotopes ^{32}P and ^{125}I. Anal. Biochem. 86, 184-192

TARTOF, K.D. (1971) Increasing the multiplicity of ribosomal RNA genes in Drosophila melanogaster. Science 171, 294-297

TARTOF, K.D. (1973) Regulation of ribosomal RNA gene multiplicity in Drosophila melanogaster. Genetics 73, 57-71

TARTOF, K.D., und I.B. DAWID (1976) Similarities and differences in the structure of X and Y chromosome rRNA genes of Drosophila. Nature 263, 27-30

VINOGRAD, J., und J.E. HEARST (1962) Equilibrium sedimentation of macromolecules and viruses in a density gradient. Progr. Chem. Org. Natl. Prod. 20, 372-422

VOELKER, R.A., und K.-I. KOJIMA (1971) Fertility and fitness of X/O males in Drosophila. I. Qualitative study. Evolution 25, 119-128

WASSERMAN, M. (1962) Cytological studies of the repleta group of the genus Drosophila: IV. The hydei subgroup. Univ. Texas Publ. 6205, 73-83

WELLAUER, P.K., und I.B. DAWID (1977) The structural organization of ribosomal DNA in Drosophila melanogaster. Cell 10, 193-212

WELLAUER, P.K., I.B. DAWID und K.D. TARTOF (1978) X and Y chromosomal ribosomal DNA of Drosophila melanogaster: comparison of spacers and insertions. Cell 14, 269-278

WELLAUER, P.K., R.H. REEDER, I.B. DAWID und D.D. BROWN (1976) The arrangement of length heterogeneity in repeating units of amplified and chromosomal ribosomal DNA from Xenopus laevis. J. Mol. Biol. 105, 487-505

WHITE, R.L., und D.S. HOGNESS (1977) R loop mapping of the 18S and 28S sequences in the long and short repeating units of Drosophila melanogaster rDNA. Cell 10, 177-192

WILSON, V.L., F.P. RINEHART und C.W. SCHMID (1976) Comparison of fractionation methods for DNA of varying base composition by equilibrium density-gradient centrifugation. Anal. Biochem. 73, 350-362

VII Anmerkung

Herrn Prof. Dr. W. Kunz danke ich für die Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. O. Hess danke ich für das Interesse und die Unterstützung meiner Arbeit. Für die Einweisung in das Arbeiten mit der D. melanogaster-Zellinie und für anregende Diskussionen bin ich Herrn Dr. U. Schäfer dankbar. Herrn Dr. R.A. Voelker (Eugene, Oregon) bin ich für die Überlassung der verschiedensten Drosophila-Stämme zu Dank verpflichtet. Die Untersuchungen wurden durch Mittel unterstützt, die den Herren Prof. Dr. W. Kunz und Dr. U. Schäfer von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellt wurden (Ku282/6 bzw. Scha278/1).

VIII Lebenslauf

Mireille Schäfer

Geburtsort und Datum:

18.10.1950 in Baden-Baden

Eltern:

Margot Michaud, geb. Mehl

Edgard Michaud, kaufmännischer Angestellter

Familienstand:

verheiratet seit dem 27.4.1973 mit Dr. Ulrich Schäfer

Schulbildung:

1957-1961 Volksschule in Offenbach/Main

1961-1967 Humanistisches Leibniz-Gymnasium in Offenbach/Main

1967-1969 Luisenschule (humanistisches Gymnasium) in Düsseldorf
Reifeprüfung im Juni 1969

Universitätsausbildung:

seit WS 1969 Studium der Biologie an der Universität Düsseldorf

März 1972 Vordiplom

März 1975 Diplom mit Hauptfach Genetik
Anfertigung der Diplomarbeit im Institut für Allgemeine Biologie

seit Mai 1975 Anfertigung der Dissertation

Praktische Tätigkeiten:

1972-1977 studentische bzw. wissenschaftliche Hilfskraft, zuerst im Institut für Zoologie und dann im Institut für Allgemeine Biologie

seit November 1977 wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Prof. Dr. W. Kunz, finanziert durch die DFG